



Inactivação Térmica de Bactérias Lácticas em Meio de Elevado Teor de Etanol

Ana Isabel de Sousa Teles

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Viticultura e Enologia

Orientador: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira

Co-orientador: Mestre Sara Correia Santos

Júri:

Presidente: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista.

Lisboa, 2013

Agradecimentos

Terminado este trabalho, gostaria de agradecer ao ISA, e a todas as pessoas que contribuíram para a sua realização, nomeadamente:

Ao Doutor Manuel Malfeito Ferreira, pelos conhecimentos transmitidos, apoio, compreensão e amizade;

À Sara Correia Santos, pela ajuda, compreensão, apoio e pela simpatia;

À Eng. Ana Carla Silva, pela ajuda no laboratório;

À D. Lena e D. Manuela, pela ajuda na preparação do material;

Aos meus colegas de laboratório, nomeadamente a Ana Ramos, pela paciência e apoio, á Inês Moraes, Viviana Monteiro, Sandro Martins, Inês Oro, Rita Abreu, Virna Dutra e Paulo Firmino, pela ajuda e amizade;

E finalmente á minha família e amigos, pelo apoio que me deram.

Resumo

Este trabalho teve como objectivo determinar as resistências térmicas de várias espécies de bactérias lácticas, eventualmente responsáveis por alteração de vinhos, permitindo quantificar os tratamentos de pasteurização aplicáveis a nível industrial.

Foram estudadas cinco estirpes de bactérias lácticas: *Oenococcus oeni*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus mali*, *L. hilgardii* e *L. plantarum*, representativas da diversidade de bactérias lácticas habitualmente encontradas em vinho.

Os ensaios de morte térmica foram realizados em meio sintético com 10% (v/v) de etanol, sendo testadas temperaturas entre 38°C e 46°C. A partir destes ensaios foram calculados os valores de redução decimal (D) para as cinco estirpes. Os valores de D variaram entre 8,3 minutos (D_{44}) para *Lactobacillus mali*, e 36,6 minutos (D_{46}) para *Oenococcus oeni*. Os valores de Z foram 5,3°C; 5°C; 3,2°C; 3,2°C e 2,5°C para *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus plantarum*, respectivamente. Em face destes valores foi possível demonstrar que, como na prática industrial se pretendem reduções de 6 D, se consegue uma redução térmica aceitável em menos de 1 segundo a 60°C.

Palavras-chave: Bactérias Lácticas de Alteração, Inactivação Térmica, Valores de D, Valores de Z, Vinho, Pasteurização.

Abstract

The objective of this work was to determine the thermal resistances of various lactic acid bacteria, eventually responsible for spoiling wines, allowing to quantify the pasteurization treatments applicable at industrial level.

This work consisted in the study of five strains of lactic acid bacteria: *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Oenococcus oeni*, representative of the diversity of lactic acid bacteria usually found in wine.

The thermal death assays were performed in synthetic medium with 10% (v/v) ethanol, and tested at temperatures between 38°C and 46°C. Through the tested temperatures the strains's D-values (time to reduce 90% of population) were calculated. The D values varied from 8.3 minutes (D_{44}) for *Lactobacillus mali*, and 36.6 minutes (D_{46}) for *Oenococcus oeni*. The Z-values were 5.3°C; 5°C; 3.2°C; 3.2°C and 2.5°C for *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus plantarum*, respectively. With these values, industrial processes requiring a 6 D reduction conducted at about 60°C for one second, are more than sufficient to guarantee the inactivation of contaminating lactic acid bacteria in the wine.

Keywords: Spoilage Acid Lactic Bacteria, Thermal Inactivation, D-values, Z-values, Wine, Pasteurization.

Extended Abstract

Lactic acid bacteria are important in oenology, since they can be responsible for changes that decrease the quality and acceptance of the final product. The lactic acid bacteria growth in must and wine can be the cause of some defects or taints. The bacteria usually involved are *Oenococcus oeni* (also involved in malic acid conversion), *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus*.

In must and wine, there can be a limited number of bacterial species, since this media are particularly selective due to its acid pH, nutritional composition and ethanol concentration.

From all the bacterial species initially present in must, not all have the same biologic potential. Tolerance to toxic substances and the nutritional requirements are different. Certain bacterial specie can rapidly and permanently disappear, while others can adapt, survive and easily multiply in wine, after alcoholic fermentation, for example *Oenococcus oeni*.

The objective of this work was to determine the thermal resistances of various lactic acid bacteria, eventually responsible for spoiling wines, allowing to quantify pasteurization treatments applicable at industrial level.

This work consisted in the study of five strains of lactic acid bacteria: *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Oenococcus oeni*, representative for the diversity of lactic acid bacteria usually found in wine.

Due to previous studies that refer the loss of ethanol adaptation from lactic acid bacteria isolated from must and wine, we tested various hypothesis of ethanol adaptation. Namely, strain inoculation directly in wine, resistance to ethanol concentrations in wine and liquid MRS; inoculation in wine, from liquid MRS with ethanol. According to the results, the chosen method was the adaptation from inoculation in MRS broth with ethanol, since it was the method that allowed better adaptation to high ethanol concentrations.

The heat treatment consisted in testing 4 temperatures: 38°C, 40°C, 42°C e 44°C. The exception was *Oenococcus oeni*, which was tested under the temperatures of 40°C, 42°C, 44°C e 46°C. Through the tested temperatures the D-values (time to reduce 90% of population) were calculated. The D-values for each strains were: *Lactobacillus hilgardii* D₃₈=116 minutes, D₄₀=79.4 minutes, D₄₂=32.6 minutes and D₄₄=8.4 minutes; *Lactobacillus mali* D₄₀=142 minutes, D₄₂=45.1 minutes and D₄₄=8.3 minutes; *Lactobacillus plantarum* D₄₀=356 minutes, D₄₂=24 minutes and D₄₄=8.4 minutes; *Leuconostoc mesenteroides* D₄₀=355 minutes, D₄₂=60.4 minutes and D₄₄=20.6 minutes e *Oenococcus oeni*, D₄₂=232 minutes, D₄₄=140.7 minutes and

$D_{46}=36.6$ minutes. *Lactobacillus mali* presented a lower value of D ($D_{44}=8.3$ minutes), while *Oenococcus oeni* presented a higher value ($D_{46}=36.6$ minutes). That means that *Oenococcus oeni* was the strain most resistant to temperature.

From these values it was possible to determine the thermal resistance for each strain represented by the Z-value, which corresponded to the temperature increase required to reduce 10 fold (one log cycle) the D-value. Of all the strains, *Lactobacillus plantarum* presented a lower thermal resistance with a value of $Z=2.5^{\circ}\text{C}$; while *Oenococcus oeni*, presented a higher thermal resistance with a value of $Z=5.3^{\circ}\text{C}$, but still within the expected range (5°C for vegetative cells). *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus mali* presented a value of $Z=3.2^{\circ}\text{C}$ and *Lactobacillus hilgardii* presented a value of $Z=5^{\circ}\text{C}$.

In conclusion, the industrial processes requiring a reduction 6 D conducted at about 60°C for one second, are more than sufficient to guarantee the inactivation of contaminating lactic acid bacteria in the wine.

Keywords: Spoilage Acid Lactic Bacteria, Thermal Inactivation, D-values, Z-values, Wine, Pasteurization.

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição da diversidade de espécies de bactérias lácticas no mosto antes da fermentação alcoólica.	3
Figura 2 – Distribuição da diversidade de espécies de bactérias lácticas no vinho depois da fermentação alcoólica.....	3
Figura 3 – Esquema das vias metabólicas do metabolismo das bactérias lácticas.....	13
Figura 4 – Esquema da degradação do ácido tartárico.	14
Figura 5 – Esquema da formação de histamina e putrescina, a partir dos aminoácidos histidina e ornitina.	15
Figura 6 – Esquema da formação de Carbamato de Etilo.	16
Figura 7 – O Valor D.	19
Figura 8 – O Valor Z.....	20
Figura 9 – Esquema do ensaio das curvas de crescimento.....	24
Figura 10 – Esquema da adaptação ao etanol, inoculação em vinho.....	26
Figura 11 – Esquema do teste de resistência ao etanol em vinho.....	27
Figura 12 – Esquema do teste de resistência ao etanol em MRS com etanol.	28
Figura 13 – Esquema da adaptação ao etanol em vinho a partir de MRS com etanol.	29
Figura 14 – Esquema da adaptação ao etanol, em MRS com etanol.....	30
Figura 15 – Esquema do ensaio da morte térmica.	31
Figura 16 – Curvas de crescimento de <i>Lactobacillus hilgardii</i> , <i>Lactobacillus mali</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	33
Figura 17 – Curva de crescimento de <i>Oenococcus oeni</i>	33
Figura 18 – Fase exponencial das curvas de crescimento para <i>Lactobacillus hilgardii</i> e <i>Lactobacillus mali</i>	34
Figura 19 – Fase exponencial das curvas de crescimento para <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	35
Figura 20 – Fase exponencial das curvas de crescimento para <i>Oenococcus oeni</i>	35
Figura 21 – Relação entre UFC/mL com D.O., para <i>Lactobacillus hilgardii</i> e <i>Lactobacillus mali</i>	36
Figura 22 – Relação entre UFC/mL e D.O. para <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	36
Figura 23 – Relação entre UFC/mL e D.O. para <i>Oenococcus oeni</i>	37
Figura 24 – Valores de D para <i>Lactobacillus hilgardii</i>	42
Figura 25 – Valores de D para <i>Lactobacillus mali</i>	43
Figura 26 – Valores de D para <i>Lactobacillus plantarum</i>	44
Figura 27 – Valores de D para <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	45

Figura 28 – Valores de D para <i>Oenococcus oeni</i>	45
Figura 29 – Valores de Z para <i>Oenococcus oeni</i> ; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Lactobacillus hilgardii</i> e <i>Lactobacillus mali</i>	46

Lista de Tabelas

Tabela 1 – As principais bactérias lácticas dos mostos e dos vinhos	2
Tabela 2 – Exemplos de valores de D e respectivas temperaturas, para estirpes de bactérias lácticas, em vinho (12,1% etanol).....	21
Tabela 3 – Valores das taxas de crescimento na fase exponencial, para cada estirpe	35
Tabela 4 – Número de células (UFC/mL) em vinho, para a estirpe <i>Lactobacillus hilgardii</i> , nas diferentes percentagens de etanol, ao longo do tempo	37
Tabela 5 – Número de células (UFC/mL) em Vinho, por cada estirpe, nas diferentes percentagens de etanol, ao longo do tempo	38
Tabela 6 – Número de células (UFC/mL) em MRS líquido, por cada estirpe, nas diferentes percentagens de etanol, ao longo do tempo	39
Tabela 7 – Número de células (UFC/mL) no vinho, por cada estirpe, nas várias percentagens de etanol, ao longo do tempo	40
Tabela 8 – Os vários valores de D e Z, para as diferentes estirpes de bactérias lácticas	47
Tabela 9 – Valores de D_T , em segundos	48

Índice

Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
1. Introdução.....	1
1.1 Bactérias lácticas no vinho	1
1.1.1 <i>Lactobacillus</i>	4
1.1.2 <i>Leuconostoc</i>	5
1.1.3 <i>Oenococcus</i>	5
1.1.4 <i>Pediococcus</i>	6
1.2 Factores limitantes de crescimento em vinho	6
1.2.1 pH.....	7
1.2.2 Etanol	7
1.2.3 Temperatura	8
1.2.4 Dióxido de Enxofre (SO ₂).....	8
1.3 Bioconversão do ácido málico	9
1.4 Defeitos provocados por Bactérias Lácticas	10
1.4.1 Pico láctico.....	11
1.4.2 Doença da gordura ou doença dos vinhos viscosos	12
1.4.3 Doença do “amargor”	13
1.4.4 Doença da Volta	14
1.4.5 Produção de aminas biogénicas	15
1.4.6 Carbamato de Etilo	16
1.5 Tratamentos térmicos em vinhos e mostos	16
1.5.1 Parâmetros Industriais de Morte Térmica.....	18
1.6 Objectivos	22
2. Material e Métodos	23
2.1 Estirpes utilizadas	23
2.2 Curvas de Crescimento	23
2.3 Adaptação ao etanol	24
2.3.1 Inoculação em Vinho	24

2.3.2 Teste de resistência ao etanol	26
2.3.3 Adaptação ao etanol em vinho a partir de MRS com etanol.....	28
2.3.4 MRS com Etanol.....	30
2.4 Morte térmica	30
2.4.1. Parâmetros de quantificação de morte térmica	31
3. Resultados e Discussão.....	33
3.1 Curvas de Crescimento	33
3.1.1 Determinação das Taxas de Crescimento.....	34
3.1.2 Relação entre UFC/mL e D.O., na fase exponencial	36
3.2 Adaptação ao etanol	37
3.2.1 Inoculação em vinho	37
3.2.2 Teste de resistência ao etanol	38
3.2.3 Adaptação ao etanol em vinho a partir de MRS com etanol.....	39
3.2.4 MRS com etanol	41
3.3 Morte térmica	41
3.3.1 Determinação dos Valores de D	42
3.3.2 Determinação dos Valores de Z.....	46
4. Conclusão.....	50
5. Bibliografia.....	51
6. Anexos.....	55

1. Introdução

1.1 Bactérias lácticas no vinho

As bactérias associadas à produção de vinho apenas incluem as bactérias lácticas e as bactérias acéticas (Barata *et al.*, 2012). As primeiras têm um papel benéfico na bioconversão do ácido málico, embora também possam ser consideradas apenas como agentes de alteração (Terrade e Orduña, 2009; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010). As segundas são apenas consideradas como microrganismos de alteração em vinhos. Uma diferença essencial entre estes dois tipos de bactérias está relacionada com o seu metabolismo. O crescimento das bactérias acéticas depende estritamente da presença de oxigénio, enquanto as bactérias lácticas crescem tanto em condições de anaerobiose como de aerobiose (Fugelsang e Edwards, 2007).

Nos mostos e nos vinhos, multiplica-se um número limitado de espécies, uma vez que estes meios são particularmente selectivos pelo seu pH ácido, a sua composição em elementos nutritivos e, em especial no caso do vinho, devido à sua riqueza em etanol. Os géneros mais frequentes em vinho são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Pediococcus* (Flanzy, 2003) (Tabela 1).

Tabela 1 – As principais bactérias lácticas dos mostos e dos vinhos. Adaptado de Flanzy (2003).

Géneros	Natureza da fermentação	Espécies
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativo	<i>P. damnosus</i> <i>P. parvulus</i> <i>P. pentosaceus</i>
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativo	<i>L. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Heterofermentativo	<i>O. oeni</i>
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativo	<i>L. mali</i>
	Heterofermentativo facultativo	<i>L. casei</i> <i>L. plantarum</i>
	Heterofermentativo	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. hilgardii</i>

O principal processo de obtenção de energia pelas bactérias lácticas é a fermentação. Estas podem realizar duas vias fermentativas, a via homofermentativa ou a via heterofermentativa. As bactérias lácticas homofermentativas fermentam hexoses, em ácido láctico. Sob crescimento lento e baixas taxas de fluxo glicolítico, as bactérias heterofermentativas produzem outro tipo de ácidos, como o formato, o acetato, o lactato e etanol como produtos (Flanzy, 2003; Zaunmüller *et al.*, 2006).

As bactérias lácticas heterofermentativas, desempenham um papel importante na produção, preservação e melhoria de alimentos. Os produtos da fermentação de açúcares e ácidos orgânicos são essenciais neste processo (Zaunmüller *et al.*, 2006). No entanto, em vinhos estes processos não são relevantes pois a fermentação em causa é a conhecida como fermentação maloláctica, ou bioconversão do ácido málico. As Figuras 1 e 2 mostram as espécies de bactérias lácticas isoladas de mostos e vinhos, respectivamente.

Num trabalho mais pormenorizado, Lonvaud-Funel *et al.* (2010), referiram que as espécies presentes no mosto em maior proporção são *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sansfranciscensis*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus casei*, *Oenococcus oeni* e

Enterococcus sp., representando mais de 80% das estirpes nesta fase de produção (Figura 1).

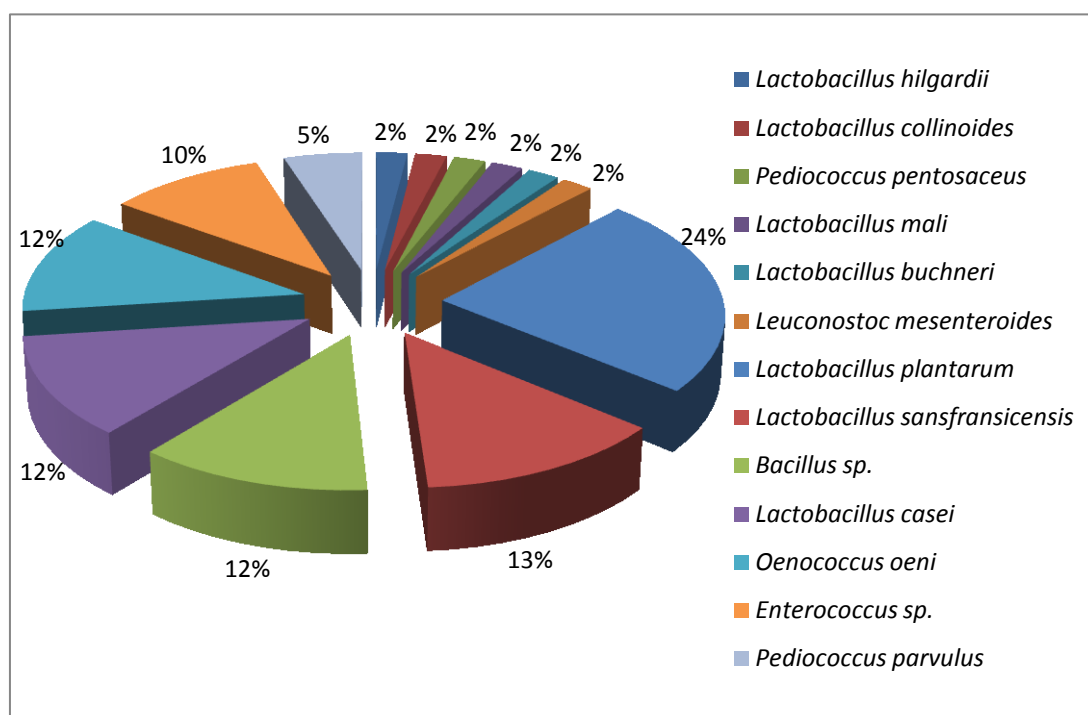


Figura 1 – Distribuição da diversidade de espécies de bactérias lácticas no mosto antes da fermentação alcoólica. Adaptado de Lonvaud-Funel *et al.* (2010).

Pelo contrário, a espécie que existe em maior proporção depois da fermentação alcoólica é *Oenococcus oeni*, que representa cerca de 80% em vinho (Figura 2).

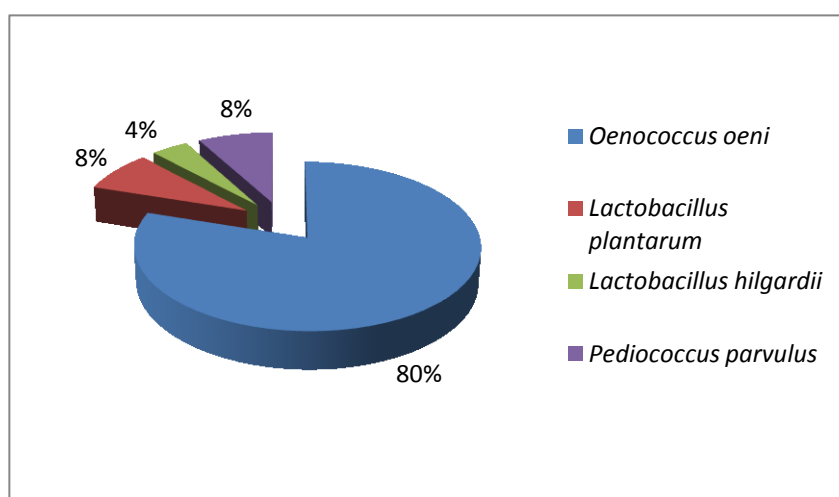


Figura 2 – Distribuição da diversidade de espécies de bactérias lácticas no vinho depois da fermentação alcoólica. Adaptado de Lonvaud-Funel *et al.* (2010).

Após a extracção do mosto, a população de bactérias varia na ordem de 10^2 - 10^4 UFC/mL. Em seguida, durante os primeiros dias de fermentação alcoólica, geralmente aumenta, mas nunca atinge mais de 10^5 UFC/mL. Por fim, como o mosto é transformado em vinho, as bactérias lácticas são submetidas a vários factores desfavoráveis. Por um lado, o crescimento explosivo das leveduras cria uma enorme redução de nutrientes, especialmente de certos aminoácidos, que as bactérias são incapazes de sintetizar e que lhes são indispensáveis. Outros elementos como as vitaminas podem faltar. Por outro lado, a toxicidade do meio aumenta continuamente, devido à acumulação de produtos do metabolismo das leveduras, onde o etanol deve ser a principal causa do declínio das bactérias (Chu-Ky *et al.*, 2005; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

1.1.1 *Lactobacillus*

O género *Lactobacillus* inclui bastonetes não esporulantes, Gram positivos, catalase negativa, geralmente não-móveis, longos e finos, ou curtos, como cocobacilos corineformes. Podem ocorrer na forma de células isoladas ou em cadeias de diferentes comprimentos. O principal produto de fermentação é o lactato. Produtos adicionais podem incluir acetato, etanol, CO₂, formato, ou succinato (Fugelsang e Edwards, 2007; Dicks e Endo, 2009).

O crescimento é anaeróbio facultativo, mas um crescimento óptimo pode ser obtido na presença de 5 a 10% de CO₂. Todas as espécies necessitam de meios complexos de crescimento com aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos derivados, vitaminas, sais, ácidos gordos ou ésteres de ácidos gordos e hidratos de carbono fermentáveis. A gama de temperatura de crescimento é de 2°C-53°C, com um óptimo entre 30°C e 40°C. Todas as espécies são ácido-tolerantes, com o crescimento de pH óptimo entre 5,5 e 6,2. Espécies foram isoladas de diversos nichos, incluindo mosto de uva, vinho, cerveja, entre outros (Dicks e Endo, 2009; König e Fröhlich, 2009).

Este género possui o maior número de espécies entre todas as bactérias lácticas. Embora muitos *Lactobacillus* tenham a capacidade de converter L-malato em L-lactato e CO₂, apenas alguns sobrevivem à fermentação alcoólica. As estirpes mais importantes em geral são *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *L. collinoides*, *L. buchneri*, *L. hilgardii*, *L. fructivorans*, *L. kunkeei*, *L. nagelii*, *L. vini*, *L. mali* e *L. fermentum*. No final da fermentação alcoólica, o crescimento das bactérias lácticas arranca e o número de células pode aumentar até 10^7 células/mL (Dicks e Endo, 2009; König e Fröhlich, 2009).

As estirpes de *Lactobacillus* menos frequentes no vinho incluem *L. pentosus*, *L. malefermentans*, *L. homohiochii*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zae*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. reuteri*, *L. helveticus*, *L. acidophilus* e *L. delbrueckii*. *L. lindneri* foi recentemente isolado a partir de vinhos australianos (Bae et al., 2006).

As estirpes de *Lactobacillus* mais frequentemente em vinhos são *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. diolivorans*, *L. fructivorans*, *L. heterohiochii*, *L. hilgardii*, *L. jensenii*, *L. kunkeeii*, *L. leichmanni*, *L. nagelli*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. trichodes*, *L. vermiforme* e *L. yamanashiensis* (Fugelsang e Edwards, 2007).

1.1.2 *Leuconostoc*

As bactérias do género *Leuconostoc* são Gram positivas, catalase negativa, sem mobilidade, elipsoidais ou esféricas. Quando crescem em meio rico em glucose ou em meio sólido podem apresentar uma forma alongada semelhante a *Lactobacillus*. As suas células podem ocorrer na forma isolada, em pares, ou em cadeias curtas a médias (Dicks e Endo, 2009; König e Fröhlich, 2009).

O crescimento em meio de cultura sólido é limitado, mas pode ser estimulado pela presença de 19,8% de CO₂, 11,4% de H₂, e 78% de N₂. O crescimento em meio sólido é estimulado pela adição de 0,05% (w/v) de cisteína. O crescimento óptimo é registado a pH 6,5 a 20°C-30°C. O crescimento pode ocorrer a 5°C, mas mais raramente (Dicks e Endo, 2009; König e Fröhlich, 2009).

A glucose é fermentada para ácido D (-) láctico, CO₂ e etanol, ou acetato. Algumas estirpes podem produzir acetato adicional em vez de etanol, quando crescem na presença de oxigénio. O L-malato é descarboxilado para L (+) lactato por algumas estirpes e apenas na presença de hidratos de carbono fermentáveis. Os polissacarídeos e álcoois, excepto manitol, não são metabolizados. A fermentação de hidratos de carbono varia consideravelmente entre diferentes espécies de *Leuconostoc* e é muitas vezes dependente da estirpe. Certas estirpes de *Leuconostoc* quando crescem em condições ácidas, fermentam sacarose. *Leuconostoc mesenteroides*, é a principal espécie presente no vinho (Dicks e Endo, 2009).

1.1.3 *Oenococcus*

O género *Oenococcus* é composto por bactérias Gram positivas, sem mobilidade, forma elipsoidal a esférica, normalmente dispostas em pares ou cadeias curtas. A morfologia das células pode variar, dependendo das condições de crescimento e do seu tempo de vida (Dicks e Endo, 2009; König e Fröhlich, 2009).

Quantidades iguais de D (-) ácido láctico, de CO₂ e etanol são formados a partir do metabolismo da glucose. A energia (ATP) é obtida por fosforilação ao nível do substrato. Os polissacarídeos e a maioria dos álcoois não são metabolizados. O crescimento é óptimo a pH 4,8, mas algumas estirpes podem preferir pH 6,0 a 6,8. Em geral, o crescimento é estimulado na presença de 10% de CO₂ (Dicks e Endo, 2009; König e Fröhlich, 2009).

Os compostos fenólicos em vinho tinto, reduzem a taxa de consumo de açúcar por *O. oeni*, mas aumentam o metabolismo do ácido cítrico, o que por sua vez leva ao aumento dos níveis de ácido acético (Dicks e Endo, 2009; König e Fröhlich, 2009).

O. oeni distingue-se de outras bactérias lácticas com base no seu crescimento a pH 4,8, resistência ao etanol. O crescimento é suportado por uma combinação complexa de aminoácidos, péptidos, hidratos de carbono fermentáveis, ácidos gordos, ácidos nucleicos e vitaminas. O crescimento em placas é bastante reforçado pela incubação semi- anaeróbia ou em microaerofilia. O crescimento óptimo ocorre entre 20°C e 30°C, mas pode demorar até 10 dias (Dicks e Endo, 2009; König e Fröhlich, 2009).

1.1.4 *Pediococcus*

As bactérias do género *Pediococcus* são Gram positivas, sem mobilidade e esféricas, mas podem apresentar uma forma ovoide. As células dividem-se para formar pares (normalmente observada no início ou a meio do crescimento exponencial) ou divididas em duas direcções perpendiculares para formar tétradas. As bactérias que pertencem a este género são anaeróbias facultativas e requerem um meio rico e de açúcar fermentável para o seu desenvolvimento. As células são pequenas (0,5-1,0 µm), catalase e oxidase negativas. O nitrato não é reduzido. A glucose é convertida para ácido láctico pela via Embden-Meyerhof. O CO₂ e etanol não são produzidos. A temperatura óptima de crescimento é de 25°C- 35°C, mas é dependente da espécie, a pH 6. Todas as espécies, excepto *Pediococcus clausenii*, produzem ácido DL-láctico a partir da glucose (Dicks e Endo, 2009; Moreno-Arribas e Polo, 2009).

Entre as espécies de *Pediococcus*, apenas quatro foram isoladas de vinhos: *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus inopinatus* e *Pediococcus pentosaceus* (Moreno-Arribas e Polo, 2009).

1.2 Factores limitantes de crescimento em vinho

Existem quatro parâmetros distintos que determinam a taxa de crescimento das bactérias lácticas no vinho: pH, temperatura, conteúdo em etanol e concentração de SO₂. Outros factores também existem, mas de menor importância, que apenas podem

ser determinantes em condições específicas. Nenhum destes factores pode ser considerado independente dos outros, actuando em conjunto (Flanzy, 2003).

1.2.1 pH

A maioria das bactérias lácticas são neutrófilas (Guzzo e Desroche, 2009), em geral, o pH óptimo para o seu crescimento está perto de neutralidade (Hutkins e Nannen, 1993). Alguns géneros de bactérias como *Lactobacillus* e *Oenococcus* mostram um comportamento mais acidófilo. Isto é, para valores de pH inferiores a 3,0, o crescimento bacteriano é difícil ou impossível. É importante não esquecer a influência de outros factores presentes no vinho (Lonvaud-Funel, 1995).

O pH do vinho afecta o metabolismo de açúcares e também tem um efeito selectivo sobre as espécies. Em vinhos com pH abaixo de 3,5, *O. oeni* geralmente domina, enquanto em vinhos com pH acima de 3,5, dominam espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus*. A capacidade das bactérias obterem energia a partir do metabolismo da glicose é inibida pelo baixo pH do vinho. O pH óptimo para o catabolismo da glicose por *O. oeni* e *L. plantarum* situa-se entre 4,5 e 6,0 (Lonvaud-Funel, 1995).

1.2.2 Etanol

O etanol produzido durante a fermentação alcoólica tem impacto no crescimento microbiano, em particular nas bactérias lácticas. É difícil especificar as concentrações que irão impedir completamente o desenvolvimento de bactérias lácticas. Radler (1966), Peynaud Domercq (1968) e Henick-Kling (1986) relataram um aumento de inibição para teores de etanol, superior a 5% (v/v). Wibowo *et al.* (1985) afirmou que a capacidade das bactérias lácticas sobreviverem e crescerem em vinho diminui à medida que a concentração de etanol aumenta acima de 10% (v/v). O crescimento óptimo (ou seja, fase lag mais curta, taxa de crescimento rápido e o rendimento mais elevado das células) na presença de 10% a 14% (v/v) ocorre entre 18°C e 20°C, enquanto o crescimento óptimo a 30°C é obtida a 0% a 4% (v/v) de etanol. Estes dados são indicativos do forte impacto de temperaturas mais elevadas na toxicidade do etanol. O grau de tolerância ao etanol é, no entanto, dependente da estirpe e também depende, além da temperatura, do pH e do estado do azoto do ambiente.

Os detalhes específicos de sensibilidade para o etanol das várias espécies de bactérias lácticas do vinho, são reduzidos e a informação é contraditória. Davis *et al.* (1988) relataram que estirpes de *Lactobacillus* e *Pediococcus* são em geral mais tolerantes a altas concentrações de etanol que *O. oeni*. De acordo com Wibowo *et al.* (1985), a maioria de *Lactobacillus* spp. pode tolerar cerca de 15% (v/v), enquanto *Lactobacillus trichodes* foi isolado a partir de vinhos com 20% de etanol.

Guerzoni *et al.* (1995) estudaram os efeitos do pH, temperatura, etanol e das concentrações de malato em *L. plantarum* e *O. oeni*. A comparação dos resultados obtidos a partir das duas estirpes representativas confirmou que *L. plantarum* é mais resistente à acção combinada de vários stresses, pelo menos quando o etanol era inferior a 6% (v/v). Este estudo sugere que *L. plantarum* é, portanto, mais competitivo nas etapas iniciais da fermentação alcoólica. No entanto, condições mais severas, como por exemplo concentrações de etanol superiores a 6% (v/v), favorecem *O. oeni*. Henick-Kling (1993) relataram que *O. oeni* era apenas parcialmente inibido por concentrações de etanol superiores a 5% (v/v) e capaz de tolerar 14% (v/v) de etanol, enquanto o crescimento de *L. plantarum* parava a partir de concentrações de etanol de 5-6% (v/v). As estirpes de *L. casei* e *L. brevis* foram descritas como sendo mais tolerantes e têm sido bem sucedidas para induzir a fermentação maloláctica (Toit *et al.*, 2011).

1.2.3 Temperatura

A temperatura influencia a velocidade de crescimento de todos os microrganismos (leveduras e bactérias). A maioria das bactérias lácticas é descrita como mesófila, com crescimento óptimo entre 25°C e 30°C, em laboratório. No vinho, a temperatura óptima de crescimento é diferente da que é obtida em cultura de laboratório. Um teor mais elevado de etanol conduzirá a uma diminuição da temperatura óptima de crescimento. Uma redução da temperatura de 5°C é suficiente (conjuntamente com outros factores desfavoráveis), para diminuir a biomassa formada e para prolongar a fermentação maloláctica por 3 semanas (Lonvaud-Funel, 1995).

A temperatura óptima para o crescimento das bactérias lácticas no vinho é de 20°C e 25°C. A 15°C ou menos, o crescimento bacteriano é menor. No entanto, Ribéreau-Gayon *et al.* (1975) afirmam que uma vez que se tenha iniciado a fermentação maloláctica a 15°C, esta pode prosseguir a temperaturas mais baixas, mas a uma taxa mais lenta. Guerzoni *et al.* (1995) estudaram os efeitos de vários factores físico-químicos (pH, SO₂, concentração de etanol e temperatura) em *O. oeni*. O aumento da temperatura apenas afecta positivamente a fase *lag* de *O. oeni*, mas não de *L. plantarum*. Um aumento de temperatura tem uma influência negativa sobre *O. oeni* e positiva sobre *L. plantarum* (Toit *et al.*, 2011).

1.2.4 Dióxido de Enxofre (SO₂)

O dióxido de enxofre é outro factor que desempenha um papel essencial no crescimento e desenvolvimento de bactérias lácticas, durante a fermentação

maloláctica. Este composto é encontrado no vinho em concentrações variáveis, de acordo com as condições de vinificação e dependendo da estirpe de levedura responsável pela fermentação alcoólica. O dióxido de enxofre é adicionado aos vinhos para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e pelo seu efeito antioxidante (Lonvaud-Funel, 1995).

O dióxido de enxofre no vinho existe sob duas formas livre e ligada. Três formas libertadas de SO₂ estão presentes no vinho: SO₂ molecular, bissulfito (HSO₃⁻) e sulfito (SO₃²⁻). A forma predominante varia de acordo com o pH do vinho. O SO₂ molecular é o principal responsável pelo efeito antimicrobiano. Este pode difundir-se para o interior das células bacterianas e reagir com os constituintes da célula. Uma vez no interior da célula interfere com pontes de proteínas e associadas com co-enzimas e vitaminas, o que finalmente provoca a morte celular (Chang *et al.*, 1997).

A sensibilidade de bactérias lácticas ao SO₂ varia. Geralmente, a concentrações de 50 a 100 mg/L de SO₂ ligado e 1-10 mg/L de SO₂ livre, o crescimento de bactérias lácticas e da fermentação maloláctica podem ser inibidos. Henick-Kling (1993) relataram uma redução da actividade maloláctica em cerca de 13 % para valores de 20 mg/L de SO₂ ligado, de 50 % para valores de 50 mg/L de SO₂ ligado e uma inibição total para valores de 100 mg/L de SO₂ ligado.

A valores de pH baixo, o efeito inibidor do SO₂ será mais perceptível, uma vez que a percentagem de SO₂ molecular activo é maior. Delfini e Morsiani (1992) investigaram a resistência do SO₂ de estirpes de bactérias lácticas de *O. oeni* e *Lactobacillus* spp. isolados de vinhos. Estes autores explicaram que os diferentes mecanismos de resistência de *O. oeni* e *Lactobacillus* spp. podem envolver a existência de um sistema de transporte de sulfito através da parede da célula, que por sua vez pode ser afectado pelo pH. Uma vez que o pH do vinho é normalmente de 3,5, o SO₃²⁻ é de pouca importância em enologia. Ambas as espécies podem permanecer inactivas durante um longo período de tempo, sem perder a capacidade de crescimento, mesmo na presença de grandes quantidades de SO₂. Algumas estirpes cresceram, na presença de diferentes concentrações de SO₂ em caldo nutritivo e foram ressuspensas em meio com 10 mg/L de SO₂, mais do que normalmente seriam capazes de tolerar. Assim, o nível de resistência de bactérias lácticas ao SO₂, pode ser melhorado pela adaptação (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Toit *et al.*, 2011).

1.3 Bioconversão do ácido málico

A fermentação maloláctica é uma bioconversão secundária no vinho, durante a qual o ácido L-málico é degradado para ácido L-láctico e dióxido de carbono. A fermentação maloláctica ocorre, geralmente, depois da fermentação alcoólica, levada a cabo por

leveduras. É importante para a desacidificação de vinhos ácidos e para a modificação do aroma. Pode ocorrer espontaneamente por acção de bactérias lácticas naturalmente presentes no vinho, ou pode ser induzida pela adição de uma ou mais estirpes de bactérias lácticas no vinho comercial (Osborne *et al.*, 2000).

A população de bactérias lácticas que sobrevive à fermentação alcoólica é da ordem de 10^3 UFC/mL. A partir 10^6 UFC/mL inicia-se a degradação do ácido málico, marcando o início da “fermentação” ou bioconversão maloláctica. O crescimento da população ocorre geralmente após uma fase de latência. A velocidade e a duração desta bioconversão estão relacionadas com a composição do vinho e com a temperatura. Esta última, pode ser controlada em ambiente de adega, através da regulação térmica das cubas, idealmente a 20°C. No entanto, se a fermentação maloláctica já tiver iniciado, o arrefecimento do vinho abaixo de 18°C, só retarda o processo, não o pára (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Em geral, o ácido málico é completamente degradado e o tempo requerido está estritamente relacionado com a quantidade de bactérias presentes bem como com a sua actividade maloláctica específica. Os parâmetros que afectam o crescimento, determinam a velocidade do processo. Os principais factores são o pH, o teor alcoólico, a temperatura e o nível de sulfitos. Não é raro encontrar vinhos com pH, teor alcoólico, temperatura e concentração de SO₂ óptimos nos quais a fermentação maloláctica é extremamente difícil de arrancar, sendo outros inibidores que não estes responsáveis (Terrade e Orduña, 2009; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

No final da fermentação maloláctica, o vinho contém uma população muito elevada de bactérias lácticas, 10^7 células/mL, quase exclusivamente composto por *Oenococcus oeni*, o que indica a sua grande importância nos vinhos (Flanzy, 2003). É neste momento que ocorre a sulfitação final na produção de vinho, destinada a eliminar todos os microrganismos (Moreno-Arribas e Polo, 2002; Terrade e Orduña, 2009; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

1.4 Defeitos provocados por Bactérias Lácticas

O crescimento das bactérias lácticas na fermentação do mosto ou vinho pode estar na origem de defeitos, ou alterações mais ou menos importantes. As bactérias envolvidas são habitualmente *Oenococcus oeni* (também envolvida na bioconversão do ácido málico), ou espécies de bactérias mais temidas do género *Lactobacillus* ou *Pediococcus* (Bartowsky, 2008).

Dependendo da natureza das estirpes, do substrato transformado e de quando as populações de bactérias se multiplicam, o vinho poderá sofrer alterações. Um caso

particular é o pico láctico, causado pela reversão da sequência de crescimento das leveduras e bactérias lácticas. Os outros defeitos são principalmente relacionados com as espécies, ou mais precisamente de estirpes particulares com vias metabólicas indesejáveis tais como a degradação do ácido tartárico, degradação do glicerol. Podem ocorrer numerosos cenários de contaminação, que podem formar aroma e flavor indesejáveis. Felizmente, as ocorrências e a maioria dos cenários de contaminação são incomuns e podem ser evitados com uma correta higiene, durante o processo de vinificação e maturação (Bartowsky, 2008; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

1.4.1 Pico láctico

Durante a fermentação alcoólica, o crescimento rápido e em massa das leveduras não deixa espaço para as bactérias lácticas. Dificulta e impede a multiplicação das bactérias durante os primeiros dias e finalmente elimina-as no meio. Priva as bactérias de elementos essenciais, especialmente durante o crescimento muito activo das leveduras. É a situação mais comum. Mas várias razões podem causar um cenário diferente (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

As bactérias lácticas podem ser encontradas num ambiente bastante favorável, por exemplo, devido ao pH elevado do mosto. A competição entre os microrganismos favorece as bactérias conduzindo a um crescimento precoce. Eventualmente, acabam por ser numerosas o suficiente para interferir com as leveduras, que por sua vez, começam a encontrar dificuldades para o fim da fermentação (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

A utilização dos açúcares e descarboxilação do ácido málico são os metabolismos bacterianos mais favorecidos nesse momento. A degradação do ácido málico não representa um problema. O mesmo não acontece para os açúcares. A quase totalidade das bactérias lácticas são heterofermentativas, portanto, o seu metabolismo pode levar à síntese de ácido D-láctico, mas também de ácido acético. Esta é a causa do aumento da acidez fixa e da acidez volátil, que caracteriza o pico láctico. A acidez volátil é constituída por uma parte de ácidos gordos pertencentes à serie que se encontram os vinhos, quer no estado livre quer no estado de sais. A acidez fixa é a diferença entre a acidez total e a acidez volátil (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

O pico láctico do vinho em garrafa é um caso muito particular, limitado a vinhos licorosos. Estes vinhos são muito doces, onde a estabilização microbiológica é, em princípio, assegurada através da adição de aguardente, mas se quase todos os microrganismos são eliminados, poderá permanecer algum. Assim as estirpes de bactérias lácticas, mais frequentemente identificadas, como *Lactobacillus fructivorans*, *L. hilgardii*, e estirpes de *O. oeni*, são capazes de sobreviver e multiplicar-se, apesar

de um elevado teor de etanol, por vezes superior a 16% (v/v). As estirpes particularmente resistentes ao etanol fermentam uma quantidade significativa de açúcares. Os vinhos são fortemente perturbados devido à multiplicação das bactérias. Tornam-se também gasosos e a acidez volátil é muito superior ao limite tolerado que é 1,0 g/L em vinho branco e rosé, e 1,2 g/L em vinho tinto. A estabilização por esterilização por filtração geralmente é impossível devido à viscosidade do produto. Os processos de estabilização térmica são os mais adequados (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

1.4.2 Doença da gordura ou doença dos vinhos viscosos

Os vinhos "viscosos" têm uma viscosidade anormalmente alta, fluem com um aspecto oleoso. Mesmo que este defeito não seja muito visível, é absolutamente intolerável quando o vinho é colocado na boca. Na maioria das vezes, os vinhos "viscosos" não têm outro defeito organoléptico. Este problema pode ocorrer em vinhos, em cubas ou barricas em fermentação alcoólica, mas é mais frequentemente encontrado em garrafa. Neste caso, é facilmente diagnosticada apenas alguns meses ou mesmo mais de um ano após o engarrafamento (Fugelsang e Edwards, 2007; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Quando a alteração está em curso, os vinhos viscosos contêm grandes populações de bactérias lácticas, geralmente mais que 10^6 UFC/mL. As bactérias associadas com este tipo de defeito pertencem ao género *Pediococcus*, mais precisamente as espécies *P. damnosus* e *P. parvulus*. Mas outras espécies, mais raramente, não são excluídas, como é o caso de *O. oeni* (Fugelsang e Edwards, 2007).

As estirpes de *Pediococcus* "viscosos" isoladas até agora, mostraram tolerância particularmente elevada aos inibidores habituais de bactérias em vinho. Elas crescem melhor em pH mais ácido, na presença de concentrações mais elevadas de etanol e mais resistentes ao SO₂. É essencial recordar que os *Pediococcus* não são todos "viscosos", mesmo que seja neste género bacteriano em que esta característica é mais comum (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010; Cardoso, 2007). Essas estirpes são facilmente transmitidas de um vinho para outro por contaminação. Quando a cuba está contaminada, constitui um verdadeiro risco para toda a adega. O vinho deve ser isolado e tratado da melhor forma possível para evitar que o incidente se espalhe (Bartowsky, 2008). A agitação mecânica do vinho permite reduzir a viscosidade. Um tratamento pode ser o suficiente para dar ao vinho um aspecto natural. Se o vinho não sofre realmente outra alteração, pode ser recuperado. A sulfitagem, a filtração, e ainda mais eficaz, o tratamento térmico permite estabilizar o vinho antes de engarrafar (Cardoso, 2007; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

1.4.3 Doença do “amargor”

O amargor excessivo de certos vinhos tintos é devido à reacção química entre a acroleína, ou o seu precursor 3-hidroxi-propionaldeído (3-HPA), e compostos fenólicos. Ele provém da degradação do glicerol por bactérias lácticas que têm uma via metabólica particular que conduz ao 1,3-propanodiol. O primeiro passo é a desidratação do glicerol, por uma enzima complexa o glicerol desidratase e o segundo passo é a redução de 3-HPA intermediário em 1,3-propanodiol. O 3-HPA pode ser oxidado em ácido 3-hidroxi-propiónico (3-HPA) (Figura 3).

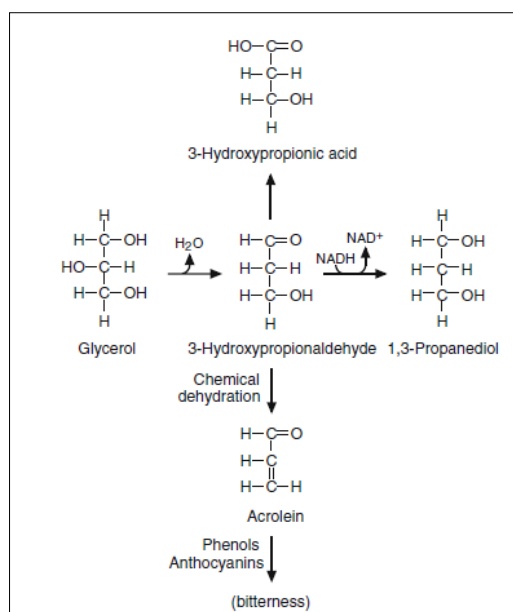


Figura 3 – Esquema das vias metabólicas do metabolismo das bactérias lácticas. Adaptado de Fugelsang e Edwards (2007).

As estirpes de bactérias lácticas do vinho que seguem o caminho do glicerol desidratase, identificadas até agora pertencem aos géneros *Lactobacillus* heterofermentativos, *Lactobacillus hilgardii* e *L. diolivorans*. No vinho, embora real, este problema é raro, muito mais rara que a doença da gordura. O amargor é muito mais predominante na indústria da sidra. Independentemente do caminho tomado, o desaparecimento de glicerol é geralmente completo e obviamente prejudicial para a qualidade, seja por causa do amargor ou aumento da acidez, o vinho é definitivamente alterado (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Os vinhos com a doença do amargor apresentam odor fraco, sabor insípido na primeira etapa da doença e amargo quando está avançada, cor do vinho rançosa, turvação e precipitação da matéria corante com formação de um sedimento de lamelas no fundo da garrafa (Lepe e Leal, 2004).

1.4.4 Doença da Volta

A volta é caracterizada por uma alteração visual do vinho que se torna muito turvo e a cor é fortemente deteriorada. É na degustação que o vinho é profundamente afectado. Este resultado é devido à degradação do ácido tartárico, o principal ácido do vinho, que conduz, entre outras, a um aumento na concentração de ácido acético, portanto, á acidez volátil. Esta doença é descrita como a mais frequente nos vinhos de regiões quentes. É provável que estes vinhos, geralmente menos ácidos, abriguem uma maior diversidade de bactérias lácticas, incluindo as estirpes capazes de degradar o ácido tartárico. Parece que esta alteração é rara, principalmente por ser causada por um escasso grupo de bactérias capazes de usar ácido tartárico como substrato. Radler (1972) estudou o metabolismo do ácido tartárico por espécies homo e heterofermentativas dos géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Apenas algumas estirpes de *L. plantarum* e *L. brevis* foram capazes de degradar o ácido tartárico. Existem duas vias metabólicas, representadas na Figura 4 (Lepe e Leal, 2004; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

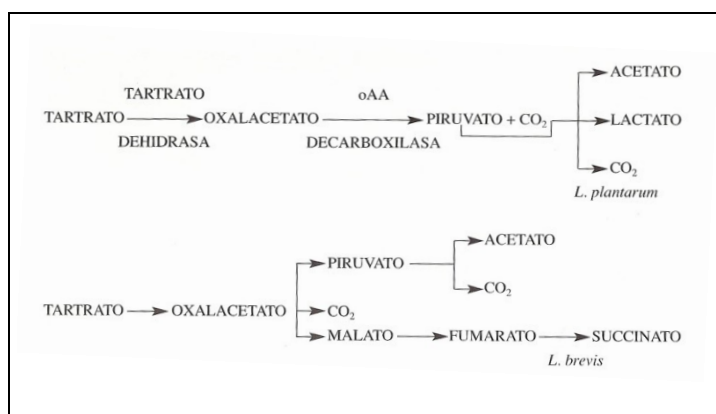


Figura 4 – Esquema da degradação do ácido tartárico. Adaptado de Lepe e Leal (2004).

O pH é um factor limitante desta alteração. Somente existem ataques bacterianos ao ácido tartárico a pH superior a 3,5, e a temperaturas superiores a 25°C (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Os vinhos contaminados, tintos e brancos, apresentam turvação e alteração da cor. Podem ainda surgir à superfície bolhas de gás, como se fermentasse lentamente. Quando a doença está avançada aparecem à superfície iridescências coloridas, como se fossem ilhotas flutuantes de gordura. O odor e sabor alteram-se profundamente, chegando a ser repugnantes, pela formação de compostos derivados da tetraidropirina (Lepe e Leal, 2004).

1.4.5 Produção de aminas biogénicas

As aminas biogénicas são formadas a partir da descarboxilação de aminoácidos devido à actividade de certas bactérias lácticas. Como tal, estes compostos encontram-se em uma variedade de alimentos fermentados, como o queijo, linguiça seca, chucrute, miso, e molho de soja. No vinho, histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, feniletilamina, e outros foram identificadas. As descarboxilações de histidina e a ornitina, formam histamina e putrescina, respectivamente (Figura 5) (Lonvaud-Funel, 2001; Fugelsang e Edwards, 2007).

As estirpes de bactérias lácticas que podem produzir histamina em vinhos pertencem a várias espécies, incluindo *O. oeni*. Estas estirpes estão naturalmente presentes nas uvas. Estudos epidemiológicos realizados para identificar estirpes produtoras de histamina em áreas diferentes demonstraram que estão espalhados por toda a vinha, irregularmente (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

A produção aminas biogénicas é maior quando o vinho permanece em contacto com as borras e gradualmente libertam os péptidos e proteínas (Lonvaud-Funel, 2001; Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Do ponto de vista da saúde, o consumo de quantidades excessivas de alimentos contendo aminas biogénicas pode resultar em dores de cabeça e outros sintomas (Fugelsang e Edwards, 2007).

Não há dúvida de que o inventário das actividades metabólicas realizadas pelas bactérias lácticas no vinho está longe de terminar. É igualmente certo de que será difícil concluir como muitos outros substratos são certamente transformadas. A sua utilização pode não ser detectada na análise, mas os produtos do seu metabolismo são capazes de alterar o vinho, mesmo em concentrações muito baixas (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

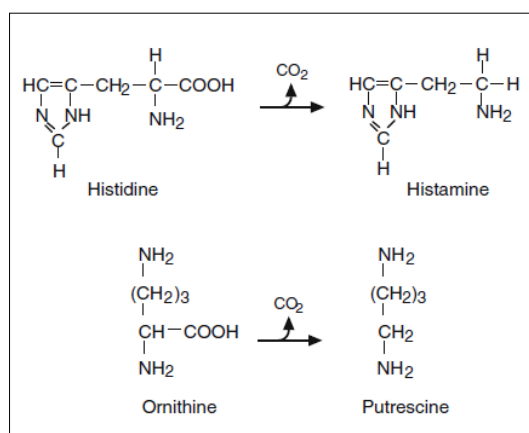


Figura 5 – Esquema da formação de histamina e putrescina, a partir dos aminoácidos histidina e ornitina. Adaptado de Fugelsang e Edwards (2007).

1.4.6 Carbamato de Etilo

Além de ácido málico, algumas bactérias lácticas heterofermentativas do vinho são capazes de formar pequenas quantidades de citrulina a partir da degradação do aminoácido arginina (Figura 6). A excreção de citrulina é de preocupação toxicológica, uma vez que é um precursor para a formação de carbamato de etilo no vinho, sendo este cancerígeno. Mira de Orduña *et al.* (2001), concluiu que o risco de formação de citrulina por bactérias lácticas em vinhos, com altas concentrações de arginina residual pode ser reduzido através da realização da fermentação maloláctica de culturas puras de *Oenococcus* e por precisamente estabelecer a conversão maloláctica completa, seguindo-se a inibição da actividade bacteriana (Moreno-Arribas e Polo. 2009).

Os resultados da pesquisa indicam a necessidade de cuidado na selecção de culturas iniciadoras para a fermentação maloláctica no vinho, uma vez que a formação de citrulina a partir da degradação de arginina, pode resultar na produção de carbamato etilo, mesmo a temperaturas normais, durante o armazenamento prolongado (Moreno-Arribas e Polo, 2009).

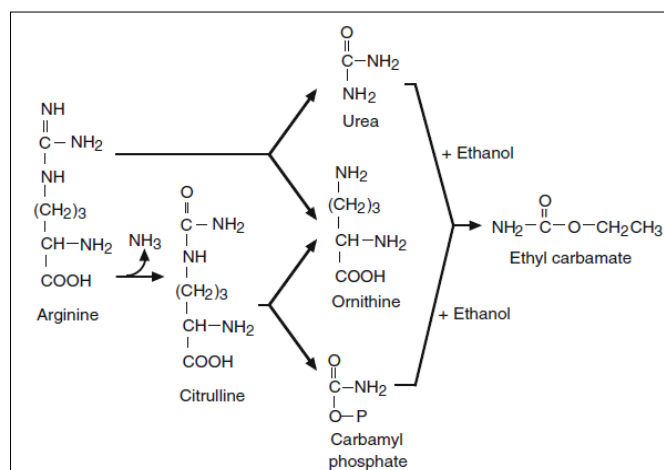


Figura 6 – Esquema da formação de Carbamato de Etilo. Adaptado de Fugelsang e Edwards (2007).

1.5 Tratamentos térmicos em vinhos e mostos

Na prática, os tratamentos que requerem a utilização da temperatura são a pasteurização de mostos ou vinhos, e o engarrafamento a quente. A temperatura (55°C a 65°C de acordo com a constituição do vinho) é a de uma pasteurização clássica, sendo no vinho utilizada apenas para a destruição de microrganismos. Além disso, a temperatura do tratamento não é atingida e mesmo a descida da temperatura noutro local não é imediata. É necessário ter em conta os períodos a temperaturas letais e a duração do aumento da temperatura e a diminuição da temperatura (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

O tratamento pode ser realizado no vinho, "a granel", antes do engarrafamento, sendo a esterilização por filtração preferida. As restrições são as mesmas em ambos os casos: o vinho tratado é "estéril", mas o problema de contaminação do tratamento posterior permanece (rolhas, garrafas, operação de tiragem, etc.) (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Recentemente, devido ao aumento do risco de contaminação do vinho por leveduras "nocivas", como *Brettanomyces*, os tratamentos de mostos durante a fermentação aplicam-se. Neste caso, o mosto é aquecido até uma temperatura de cerca de 80°C-90°C, muito rapidamente (permutador de calor tubular ou de placas). Esta temperatura é mantida durante alguns segundos, e depois arrefecida também muito rapidamente. Mais uma vez, quando o tratamento é feito com cuidado, os riscos de desvios organolépticos são mínimos. A mesma operação pode ser executada em vinhos tintos durante o envelhecimento ou vinhos brancos doces (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

O processo de engarrafamento a quente tem como objectivo destruir os microrganismos do vinho susceptíveis de se desenvolver e alterar o vinho em garrafa. O vinho é aquecido a uma temperatura de 43°C-45°C durante 30 segundos, é colocado em garrafa a esta temperatura, arrefece espontaneamente. A temperatura, relativamente baixa, está associada a um tempo de exposição elevado, uma vez que a queda da temperatura, é muito lenta nas garrafas armazenadas. E este processo, proposto por Baillot Estiveaux nos anos 60 denominado termolização, é utilizado actualmente, tanto no engarrafamento dos vinhos tintos como nos vinhos brancos e é particularmente eficaz para vinhos doces (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Do ponto de vista da estabilidade biológica dos vinhos, os resultados obtidos são excelentes e as críticas de perda de qualidade organoléptica não se justificam, quando o tratamento é feito correctamente. É importante controlar os aspectos físicos do processo, como o tempo de exposição do vinho a temperatura fixa e as outras configurações da enchedora, para que o nível de enchimento seja consistente com as normas em vigor após o resfriamento. A escolha da rolha deve reflectir os critérios dimensionais e seu tratamento superficial. Para um tratamento de engarrafamento, a estabilização físico-química do vinho deve primeiro ser assegurada, em especial, na casse proteica (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Em todos os casos, algumas regras são fundamentais:

- O tratamento deve ser feito na ausência do ar;
- O nível de temperatura e tempo de exposição deve ser estabelecido de acordo com os objectivos e os meios utilizados. Em geral, na prática, o tratamento é muitas vezes excessivo, o que pode explicar as críticas frequentemente feitas;

- No caso de tratamento de doenças microbianas, devem ser tratados o mais cedo possível, logo que o problema é identificado. É também evidente que o tratamento destrói os microrganismos e, assim, parando a sua actividade, mas não corrigindo os defeitos analíticos ou organolépticos já criados por este desenvolvimento microbiano (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

Em resumo, em enologia, em termos de controlo da actividade microbiana é possível utilizar um tratamento térmico para:

- Acelerar o crescimento: aquecimento da colheita, aquecimento de cubas para a fermentação maloláctica;
- Parar o crescimento: a destruição térmica de leveduras ou bactérias. Por exemplo, o tratamento de mostos em caso de contaminação por *Brettanomyces*, engarrafamento a quente, pasteurização dos vinhos (vinhos espumantes) (Lonvaud-Funel *et al.*, 2010).

1.5.1 Parâmetros Industriais de Morte Térmica

A morte térmica, a uma determinada temperatura, corresponde à taxa de morte depende do número de células viáveis presentes. É dada pela seguinte equação:

$$dN/dt = -cN \quad (1)$$

Onde:

dN/dt , é a taxa de morte;

N , é o número de células viáveis presentes e

c , é a constante de proporcionalidade.

O sinal de menos significa que N está a diminuir (Adams e Moss, 1995).

Para informações sobre o número de células sobreviventes após o período de aquecimento, esta equação pode ser integrada entre o tempo zero e o tempo t para dar:

$$\text{Log}_e (N/N_0) = -ct \quad (2)$$

ou

$$N = N_0 e^{-ct} \quad (3)$$

Onde, N e N_0 são os números de células viáveis presentes no tempo t e 0 , respectivamente (Adams e Moss, 1995).

Em termos industriais, é mais conveniente representar a equação (2) em termos logarítmicos na base de 10 como:

$$\text{Log}_{10} (N/N_0) = -kt \quad (4)$$

Onde, $k = c/\log_e 10 = c/2,303$.

A partir da equação (4), é evidente que um gráfico de \log do número de células sobreviventes a uma dada temperatura em função do tempo, deve dar uma linha recta com uma inclinação negativa, k . Quando a temperatura aumenta, de modo que o declive da curva de sobrevivência também aumenta. A partir desta relação pode derivar uma medida da resistência ao calor de um organismo, que é útil para o cálculo da letalidade dos processos térmicos (Adams e Moss, 1995).

O valor D ou tempo de redução decimal é definido como, o tempo a uma dada temperatura para que a sobrevivência da população seja reduzida por 1 ciclo logarítmico, a 90% (Figura 7). A temperatura à qual se aplica um valor D é indicada por um subscrito, por exemplo D_{65} . Um valor de D pode ser obtido a partir de um gráfico \log_{10} de sobreviventes em função do tempo, em que é o inverso do declive, $1/k$ (Adams e Moss, 1995).

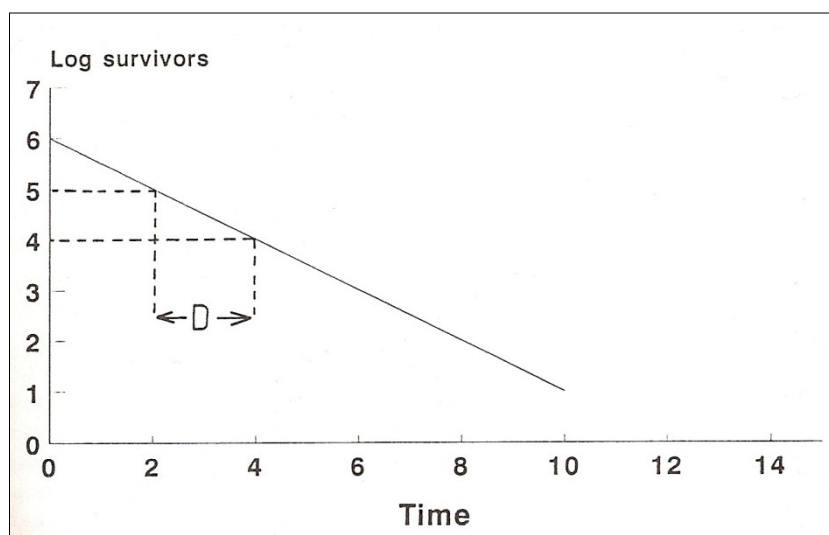


Figura 7 – O Valor D . Adaptado de Adams e Moss (1995).

Alternativamente pode ser calculada a partir de:

$$D = (t_2 - t_1) / (\log N_1 - \log N_2) \quad (5)$$

Onde, N_1 e N_2 são os sobreviventes para os tempos t_1 e t_2 , respectivamente. Uma consequência da equação (5), é que nunca se pode prever com certeza quantas reduções decimais um processo de calor deve atingir (a sua letalidade) para um produto ser estéril, pois não há $\log N_2$ para $N_2 = 0$ (Adams e Moss, 1995).

À medida que a temperatura é aumentada, o valor de D diminui. Este é um processo exponencial no intervalo de temperaturas utilizadas no processamento térmico de alimentos, de modo que o gráfico do $\log D$ contra temperatura dá uma linha recta (Adams e Moss, 1995).

A partir disto, pode derivar um outro parâmetro importante para o processamento térmico, Z , que é a mudança de temperatura que resulta numa mudança de dez vezes (1 log) em D (Figura 8).

$$Z = (T_2 - T_1) / (\log D_1 - \log D_2) \quad (6)$$

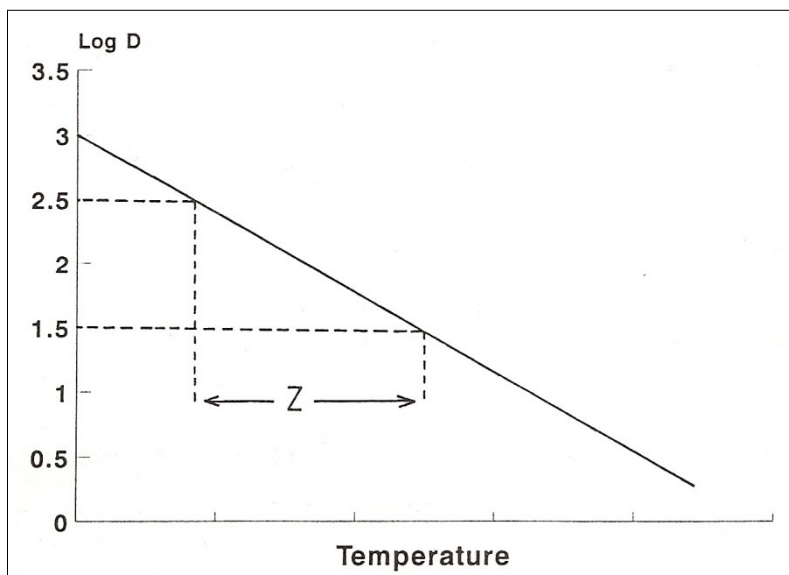


Figura 8 – O Valor Z . Adaptado de Adams e Moss (1995).

O conhecimento do valor Z de um organismo é importante, se quisermos ter em conta o efeito letal de diferentes temperaturas experimentadas durante um processo de aquecimento (Adams e Moss, 1995).

Tabela 2 – Exemplos de valores de D e respectivas temperaturas, para estirpes de bactérias lácticas, em vinho (12,1% etanol). Adaptado de Splittstoesser (1975).

Estirpe	T (°C)	Valor de D
<i>Lactobacillus plantarum</i>	45	0,35 min.
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	45	0,12 min.
<i>Oenococcus oeni</i>	43	0,33 min.

1.6 Objectivos

Este trabalho foi realizado tendo em conta a ausência de dados actuais sobre a inactivação térmica de bactérias lácticas, responsáveis por alterações do vinho.

Assim, tivemos como objectivo determinar as resistências térmicas, na presença de etanol, de diferentes bactérias lácticas, responsáveis por alterações de vinhos, tendo em vista estabelecer as bases para o dimensionamento dos tratamentos térmicos aplicados na indústria do vinho.

As bactérias lácticas escolhidas para o estudo foram: *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Oenococcus oeni*.

Devido à existência de estudos que afirmam que as bactérias lácticas isoladas de vinho e mosto, perdem a sua adaptação ao etanol, foram testadas várias hipóteses de adaptação destas bactérias ao etanol.

2. Material e Métodos

2.1 Estirpes utilizadas

Neste trabalho prático foram utilizadas 5 estirpes de bactérias lácticas provenientes da Coleção Espanhola de Culturas Tipo (CECT), nomeadamente as estirpes *Lactobacillus hilgardii* CECT 4786 isolada de vinho, *Lactobacillus mali* CECT 4149^T de mosto de vinho, *Lactobacillus plantarum* CECT 748^T de couves em conserva, *Leuconostoc mesenteroides* CECT 219^T de azeitonas fermentadas e *Oenococcus oeni* CECT 217^T isolada de vinho. As estirpes foram mantidas em MRS Agar (Man Rogosa Sharpe, Biokar Diagnostics, Beauvais, agar 20 % v/v) (Anexo I).

2.2 Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento foram feitas, com o objectivo de relacionar a densidade óptica (D.O.) com o número de células viáveis (Anexo III). Para as curvas de crescimento das estirpes, 100 mL de MRS líquido foram inoculados num balão Erlenmeyer, com ansada de biomassa de uma estirpe, previamente crescida em MRS Agar. Este volume foi dividido em alíquotas de 1,5 mL incubadas a 28°C. O crescimento foi acompanhado em intervalos de tempo determinados, de 20 em 20 minutos, 30 em 30 minutos, de uma em uma hora, ou de 2 em 2 horas, dependendo da estirpe e da velocidade do crescimento, até o crescimento ter atingido a fase estacionária. Em cada ponto, para uma alíquota, foi medida a D.O a 660 nm em espectrofotómetro (S-20 Spectrophotometer, Boeco Germany). Foram feitas as diluições necessárias e o espalhamento em placa de MRS Agar, em duplicado. As placas foram depois incubadas a 28°C durante 48-72 h (Figura 9). Com os dados obtidos nesta experiência, foram construídos gráficos das curvas de crescimento, das taxas de crescimento e com a relação entre D.O. e células viáveis, para cada estirpe.

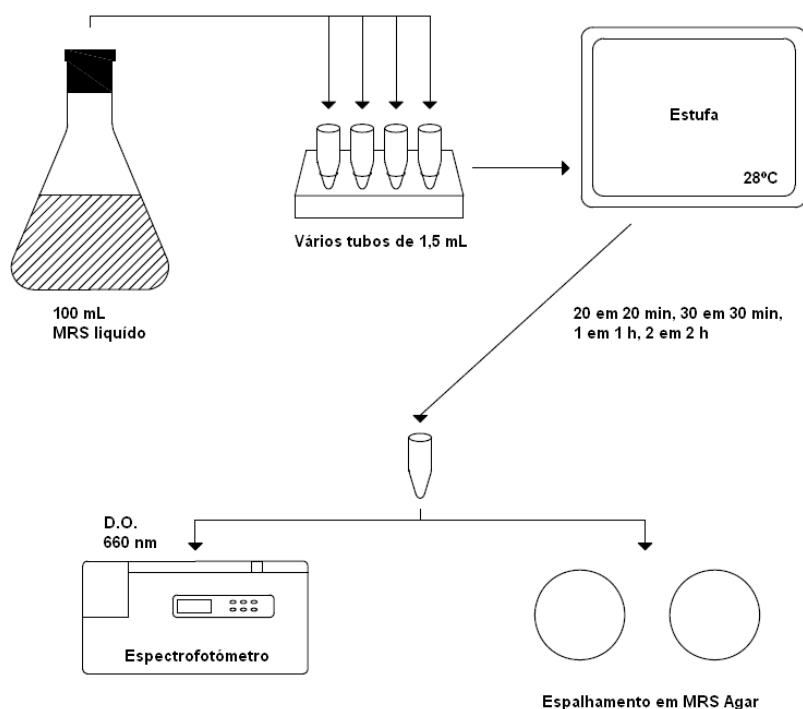


Figura 9 – Esquema do ensaio das curvas de crescimento.

2.3 Adaptação ao etanol

A adaptação ao etanol foi feita, devido a haver estudos anteriores que relatam que bactérias lácticas isoladas de vinho, perdem a sua adaptação ao etanol, por isso foi necessário adaptá-las e para tal foram feitas várias abordagens.

2.3.1 Inoculação em Vinho

2.3.1.1 Preparação do vinho

Antes de se iniciar este procedimento, os seguintes parâmetros do vinho foram analisados (Anexo II):

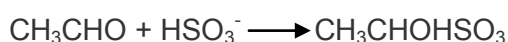
- Massa volúmica a 20°C expressa em g/dm³ segundo a Norma Portuguesa (NP) 2142;
- Teor alcoólico volumétrico em percentagem a 20 °C segundo a NP2143;
- Acidez total expressa em g/dm³ de ácido tartárico segundo a NP 2139;
- Acidez fixa expressa em g/dm³ de ácido tartárico segundo a NP 2141;
- Acidez volátil corrigida expressa em g/dm³ de ácido acético segundo a NP 2140;
- pH, através de potenciômetro;
- Anidrido sulfuroso livre expresso em mg/dm³ segundo a NP 2220;

- Anidrido sulfuroso total expresso em mg/dm³ segundo a NP 2220;
- Açúcares expressos em g/dm³ segundo a NP 2223;

Estas análises foram realizadas no Laboratório Ferreira Lapa.

O dióxido de enxofre, presente no vinho, tem como objectivo inibir o crescimento microbiano. Desta forma, para retirar um factor limitante do crescimento e permitir o desenvolvimento das culturas inóculas, foi essencial corrigir o seu valor no vinho.

O sulfuroso foi neutralizado através da adição de uma solução de acetaldeído, que permitiu reduzir a zero o sulfuroso livre. Como é expresso na reacção abaixo, um mole de etanal reage com 1 mole de sulfito (sulfuroso livre), originando 1 mole de acetaldeído:



Através da estequiometria da reacção, foi calculada a quantidade de etanal a adicionar ao vinho de forma a reagir na totalidade com o sulfuroso livre (sulfito).

A percentagem de etanol no vinho foi ajustada a 1,5%, 3%, 5%, 7,5%, 10%, 11%, 12%, 12,5% e 13%. Para aumentar a percentagem de etanol foi necessário adicionar etanol, em que o aumento de 1% de etanol corresponde á adição de 1 mL de etanol em 100 mL de vinho. Para diminuir a percentagem de etanol foi necessário adicionar uma solução de ácido tartárico (5 g/L). Calculou-se qual a quantidade total necessária adicionar desta solução no vinho, de modo a diluir a percentagem de etanol. Neste passo optou-se por adicionar uma solução aquosa de ácido tartárico, de modo que o vinho final tivesse uma acidez total semelhante a um vinho comercial.

O pH do vinho foi acertado a 3,5 com adição de uma solução de HCL 1M, para diminuir e NaOH 1M para aumentar. O vinho foi seguidamente esterilizado por filtração (filtro Milipore 0,22 µm) para eliminar microrganismos indesejados para o ensaio.

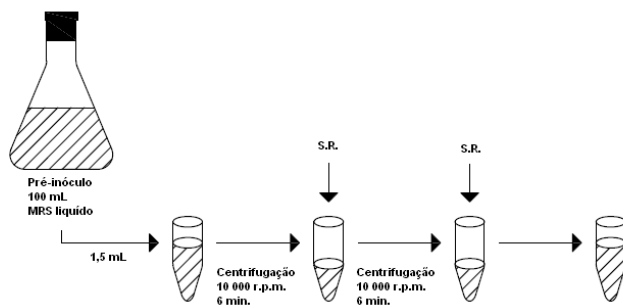
Depois de efectuada a neutralização do sulfuroso e o ajustamento do etanol, o vinho foi novamente analisado, para confirmar estes valores.

2.3.1.2 Inoculação

Fez-se um pré-inóculo da estirpe a estudar, em MRS líquido. Atingida a fase exponencial (verificada através da medição da D.O. 0,3-0,5, a 660 nm e do gráfico da relação entre UFC/mL e D.O.), foram retirados 1,5 mL de suspensão celular que foram centrifugados durante 6 minutos a 10 000 r.p.m. Foi retirado o sobrenadante e as células no sedimento, ressuspensas em 1,5 mL de Solução de Ringer (S.R.). O passo de lavagem foi repetido. O sedimento foi ressuspenso em 1,5 mL de S.R. e inoculado

para cada uma das percentagens de etanol descritas anteriormente, foi preparado um balão de vidro com 100 mL de vinho ao qual foi adicionado 100 µL de suspensão de cada estirpe. Depois de homogeneizada a suspensão, mediu-se a D.O. a 660 nm. Foi feito um espalhamento em placa de MRS para verificar o crescimento/morte das bactérias no vinho. Nos três dias seguintes mediu-se a D.O. uma vez por dia e repetiu-se o procedimento. As placas foram incubadas a 28°C durante 48-72h (Figura 10).

(A)



(B)

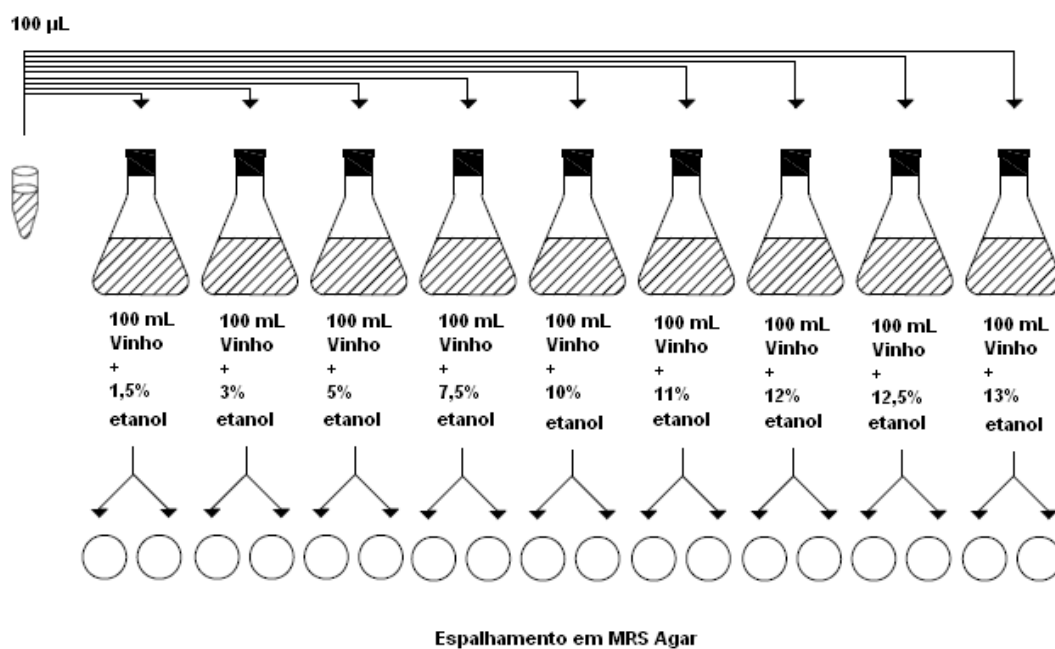


Figura 10 – Esquema da adaptação ao etanol, inoculação em vinho, (A) centrifugação do pré-inóculo, (B) inoculação no vinho a várias percentagens de etanol.

2.3.2 Teste de resistência ao etanol

Nesta fase foram testadas duas abordagens. Foi testado o crescimento directamente em vinho e num meio de cultura controlado que pretendia simular as condições do vinho, MRS com adição de etanol.

2.3.2.1 Em Vinho

No início da experiência foi novamente feito um pré-inóculo em MRS líquido da estirpe a estudar. Atingida a fase exponencial (D.O. 0,3-0,5), foram retirados 1,5 mL de suspensão celular que foram centrifugados durante 6 minutos a 10 000 r.p.m. Foi retirado o sobrenadante e as células, encontradas no **sedimento**, ressuspensas em 1,5 mL de Solução de Ringer (S.R.). O passo de lavagem foi repetido. O **sedimento** foi ressuspensão em 1,5 mL de S.R. e inoculado em 3 balões, um com MRS líquido com etanol 0% (controlo), e dois em vinho com 5% e 12 % de etanol. Foi feito o espalhamento em duplicado a partir de cada balão em MRS Agar, e as placas inoculadas a 28°C durante 48-72h. Nos dois dias seguintes, foi realizado o espalhamento uma vez por dia (Figura 11).

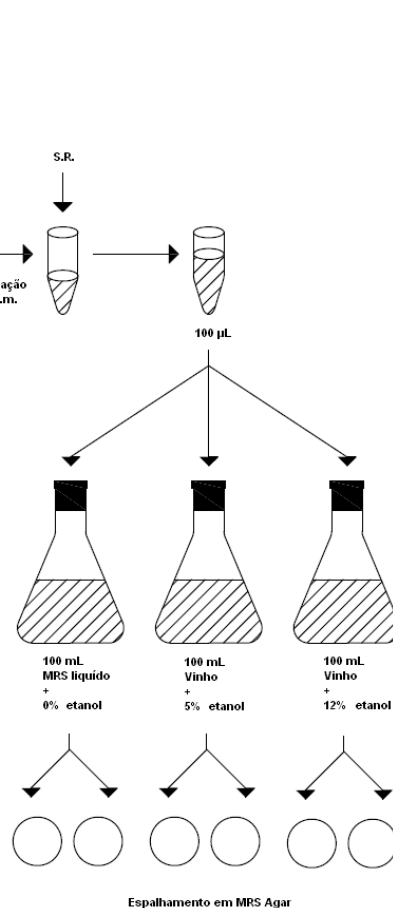


Figura 11 – Esquema do teste de resistência ao etanol em vinho.

2.3.2.2 Em MRS com etanol

A partir de um pré-inóculo em MRS líquido, na fase exponencial (D.O. 0,3-0,5) inoculou-se 1 mL de cultura em 100 mL de MRS líquido com 1,5% de etanol. Homogeneizou-se e fez-se o espalhamento, em duplicado, em MRS Agar. As placas foram incubadas a 28°C durante 48-72h.

Quando a cultura voltou a atingir fase exponencial (D.O. 0,3-0,5) na presença de 1.5 % de etanol, 1mL da suspensão celular foi inoculada em 100 mL de MRS líquido com 3% de etanol. Fez-se o espalhamento, em duplicado, em MRS Agar, voltando a repetir-se este passo nos dias seguintes para MRS líquido com concentrações crescentes de etanol (5%, 7.5% e 10 %) (Figura 12).

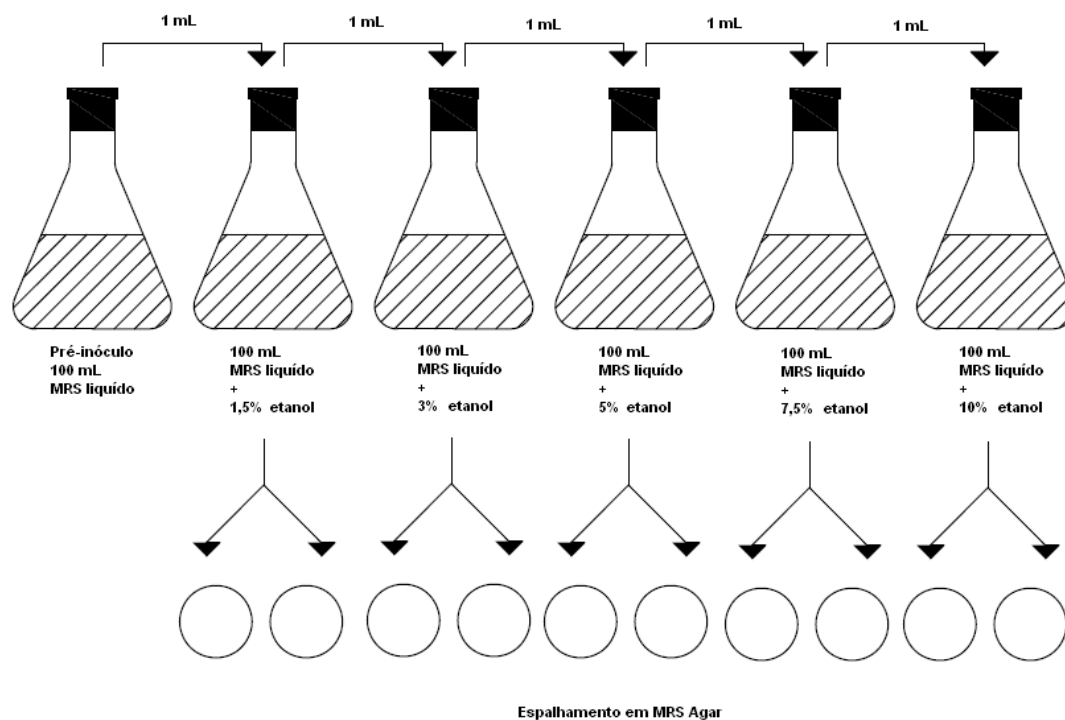


Figura 12 – Esquema do teste de resistência ao etanol em MRS com etanol.

2.3.3 Adaptação ao etanol em vinho a partir de MRS com etanol

A partir de um pré-inóculo em MRS líquido, na fase exponencial inoculou-se 1 mL em 100 mL de MRS líquido com 1,5% de etanol. Homogeneizou-se e incubou-se a 28°C. Atingida a fase exponencial (D.O. 0,3-0,5), homogeneizou-se e inoculou-se 1 mL em 100 mL de MRS líquido com 3% de etanol. Fez-se o mesmo procedimento para MRS com 5% e 7,5% de etanol.

Quando a cultura celular no balão de MRS líquido com 7,5% de etanol atingiu a fase exponencial, para além de se realizar a passagem de inóculo para MRS líquido com 10 % de etanol, foram retirados 1,5 mL de suspensão celular que foram centrifugados durante 6 minutos a 10 000 r.p.m. Foi retirado o sobrenadante e as células, encontradas no sedimento, ressuspensas em 1,5 mL de Solução de Ringer (S.R.). O passo de lavagem foi repetido. O sedimento foi ressuspenso em 1,5 mL de S.R. foi ainda feita a inoculação de 100 µL da suspensão de cada estirpe, em 100 mL de vinho com 7.5 % de etanol. Quando a cultura celular no balão de MRS líquido com 10% de

etanol atingiu a fase exponencial, procedeu-se da mesma forma acima descrito e inoculou-se e 100 μ L da suspensão em 100 mL de vinho com 7,5% e com 10% de etanol.

Homogeneizou-se e fez-se o espalhamento em duplicado em MRS Agar nos três casos. As placas foram incubadas a 28°C durante 48-72h (Figura 13).

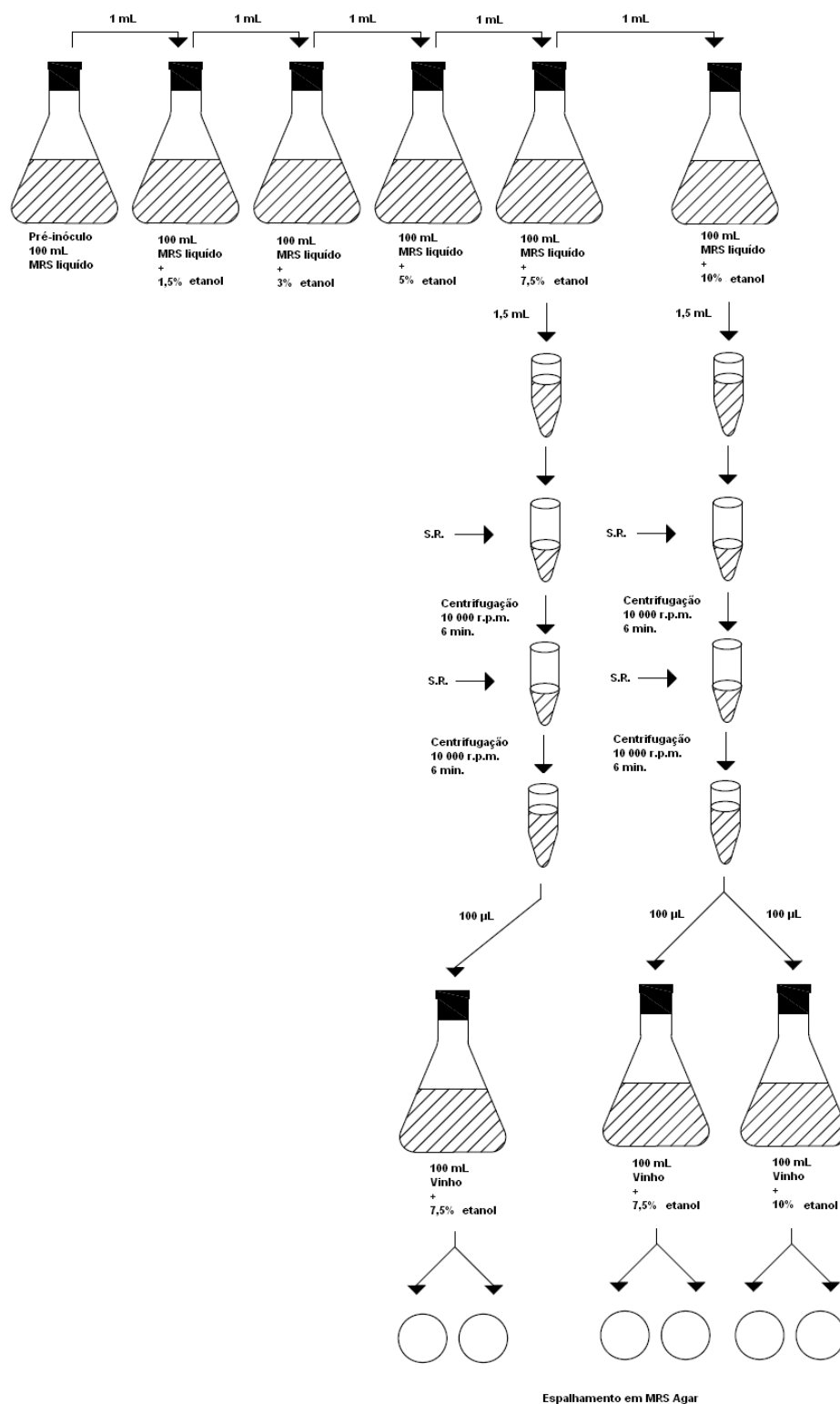


Figura 13 – Esquema da adaptação ao etanol em vinho a partir de MRS com etanol.

2.3.4 MRS com Etanol

Para a realização deste ensaio foi feito um pré-inóculo em MRS líquido. O crescimento da cultura foi seguido até atingir a fase exponencial (D.O. 0,3-0,5), uma vez que é nesta fase que as células têm o seu metabolismo mais acelerado, proporcionando assim uma adaptação ao etanol mais rápida e eficaz.

Cada uma das estirpes foi inoculada num tubo com MRS líquido com 3 % de etanol, e incubadas a 28°C durante 48-72h. Depois de atingida novamente a fase exponencial a cultura foi utilizada para inocular um novo tubo de MRS líquido com 5% de etanol, que foi incubado nas mesmas condições. Este procedimento foi repetido mais três vezes, para MRS líquido com concentrações crescentes de etanol, 7,5% seguido de 10% e 12.5%. Em paralelo, foi efectuado um controlo da pureza da cultura através de riscado em placa, incubado a 28°C durante 48-72h. Este procedimento foi repetido para cada uma das estirpes (Figura 14).

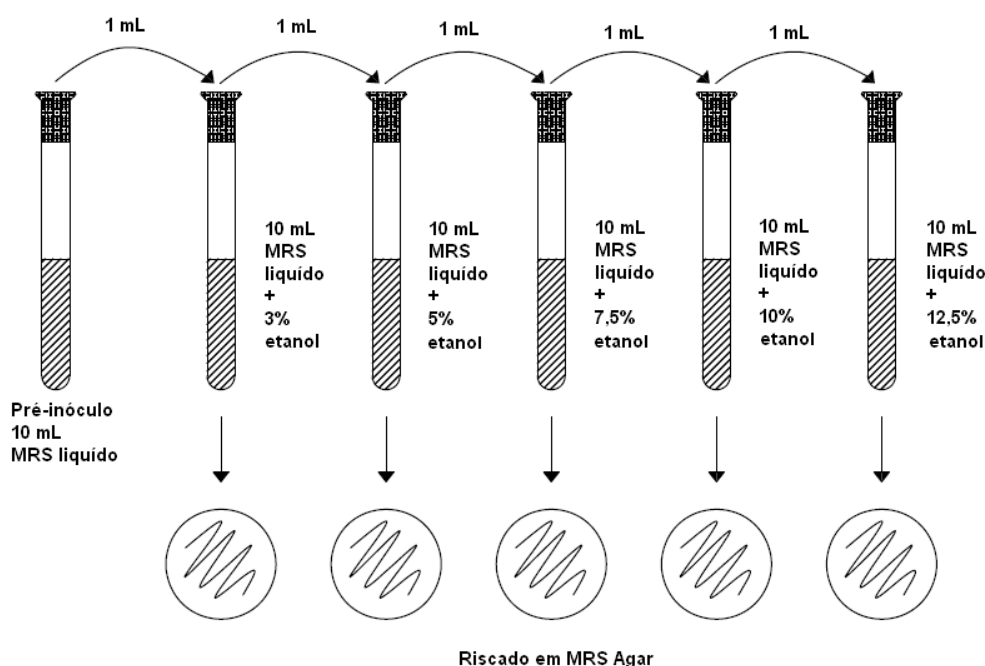


Figura 14 – Esquema da adaptação ao etanol, em MRS com etanol.

2.4 Morte térmica

Neste passo foram utilizados pré-inóculos as culturas de bactérias, em fase exponencial (D.O. 0,3-0,5), previamente adaptadas a concentrações de etanol de 10%.

O ensaio de morte térmica foi realizado em banho de água. Para cada estirpe foram testadas 4 temperaturas, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C. A exceção foi *Oenococcus oeni* CECT 217^T para a qual foram testadas as temperaturas de 40°C, 42°C, 44°C e 46°C. Para cada ensaio foram realizadas três réplicas.

Num tubo com 10 mL de MRS líquido com 10 % de etanol foi inoculado uma quantidade inicial de células conhecida, de tal forma que no tempo zero (t_0) o número de colónias em placa fosse contável.

O primeiro ponto foi realizado no tempo zero (t_0), correspondente ao tempo de inoculação. Daí em diante, foram efectuados pontos de 5 em 5 minutos ou de 1 em 1 minuto, até aos 60 minutos.

A cada tempo de amostragem e em duplicado, fez-se o espalhamento da cultura em placas de MRS Agar que foram incubadas a 28°C durante 48-72h (Figura 15).

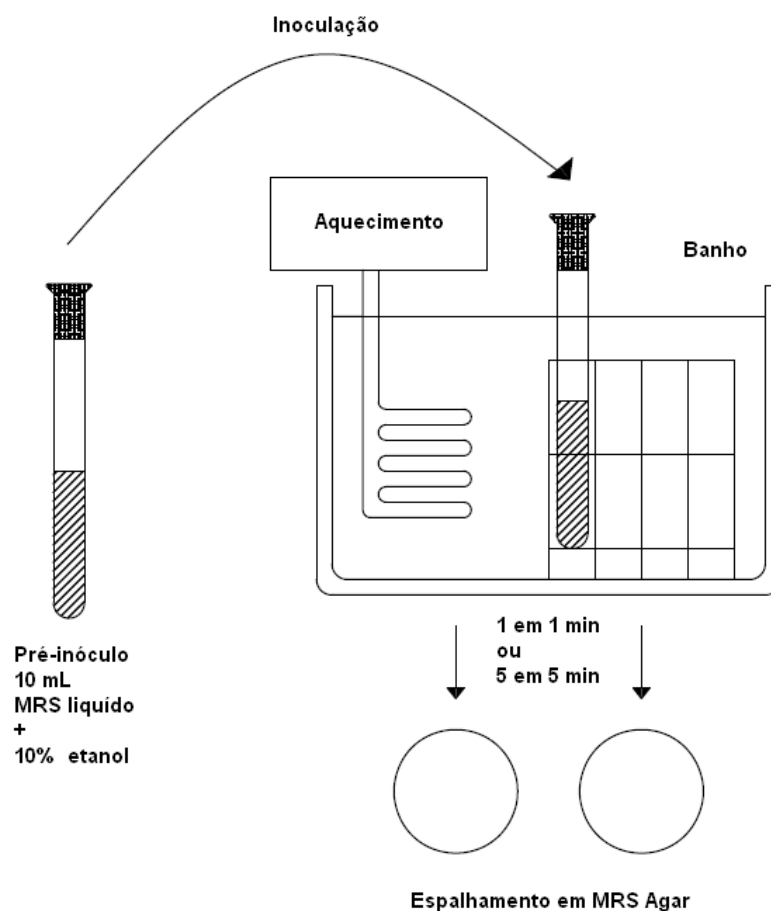


Figura 15 – Esquema do ensaio da morte térmica.

2.4.1. Parâmetros de quantificação de morte térmica

Com os valores obtidos no passo anterior, foram construídos gráficos de morte térmica por temperatura, ao longo do tempo. A partir destes gráficos foi ainda calculado o valor D e o valor de Z. O valor D ou tempo de redução decimal é o intervalo de tempo a temperatura constante de tratamento para uma redução de 90% da população de

microrganismos viáveis. O valor Z é o aumento de temperatura necessário para reduzir 10 vezes (um ciclo logaritmo) o valor D.

Os valores de D foram calculados a partir 1/ (módulo do declive da recta), retirada a partir dos gráficos da percentagem (%) de sobrevivência em função do tempo (min.).

Os valores de Z foram calculados a partir de 1/ (módulo do declive da recta), retirada a partir dos gráficos dos valores de D (min.) em função da temperatura (°C).

Estes gráficos foram realizados no programa *Origin*, e os valores de D e Z foram calculados a partir deste programa.

3. Resultados e Discussão

3.1 Curvas de Crescimento

Abaixo estão representadas das curvas de crescimento para cada estirpe (Figuras 16 e 17). Estas curvas de crescimento, relacionam as D.O. com o tempo (h), podendo-se verificar as diferentes fases de crescimento (lag e exponencial). Sendo que a fase estacionária não é completada, havendo apenas um crescimento muito lento.

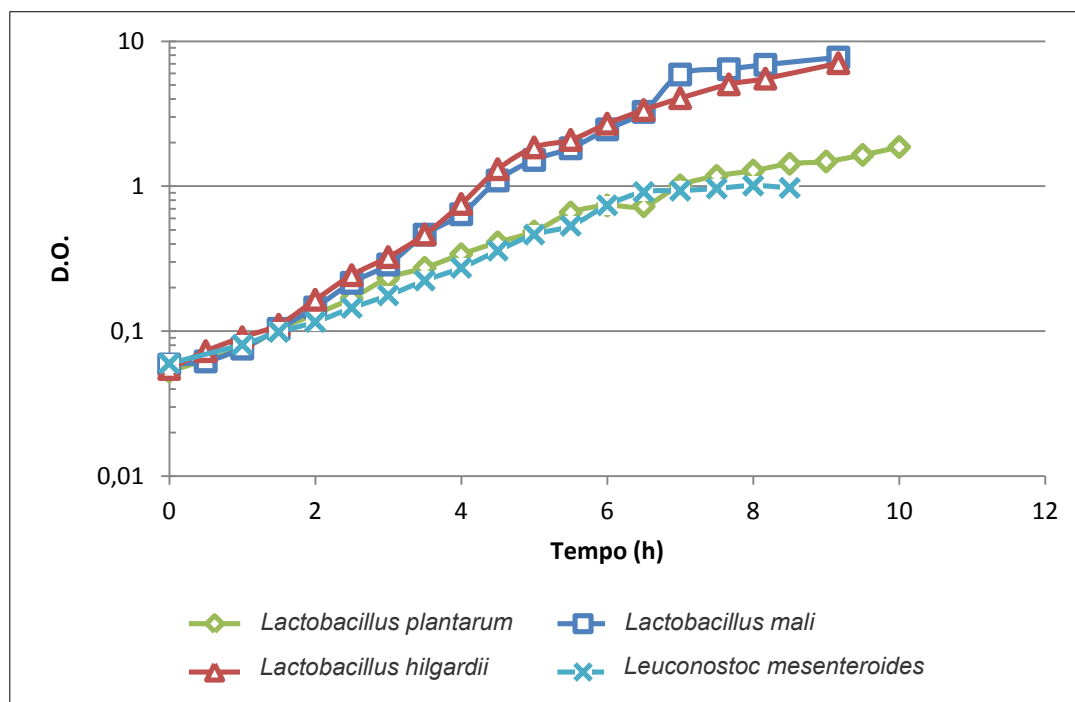


Figura 16 – Curvas de crescimento de *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, em meio MRS.

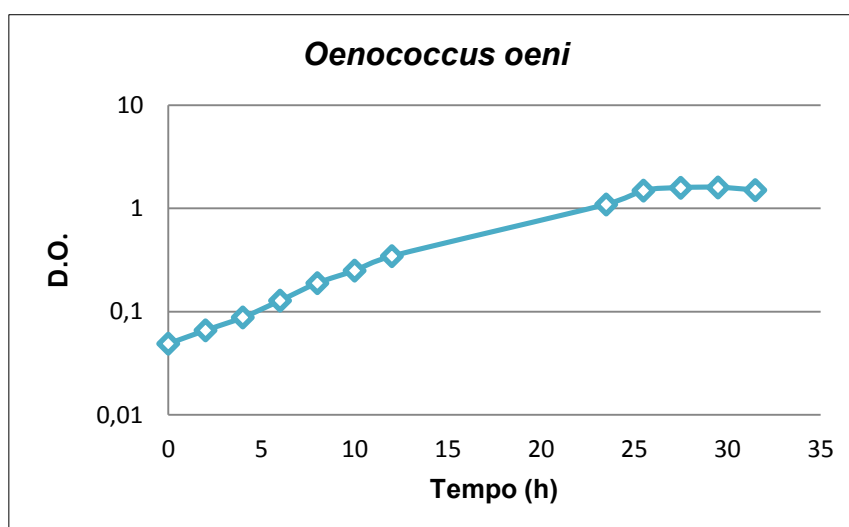


Figura 17 – Curva de crescimento de *Oenococcus oeni*, em meio MRS.

Pode-se verificar que as curvas são semelhantes. Para *Lactobacillus hilgardii* a fase lag durou aproximadamente 1,5 horas, a fase exponencial durou 6h e 50 minutos. Para *Lactobacillus mali* a fase lag durou aproximadamente 1,5 horas e a exponencial durou 5h e 10 minutos. Para *Lactobacillus plantarum* a fase lag durou aproximadamente 1,5 horas e a fase exponencial durou 7,5 horas. Para *Leuconostoc mesenteroides* a fase lag durou aproximadamente 1,5 horas e a fase exponencial durou 6,5 horas. Para *Oenococcus oeni* a fase lag durou aproximadamente 4 horas e a fase exponencial durou 23,5 horas. A bactéria que estabilizou primeiro foi *Lactobacillus mali*.

3.1.1 Determinação das Taxas de Crescimento

As Figuras 18, 19 e 20 representam os valores de D.O. em função do tempo, na fase exponencial de crescimento.

As taxas de crescimento foram calculadas a partir do declive de cada equação da recta, para cada estirpe.

Os valores das taxas específicas de crescimento estão representados na Tabela 3.

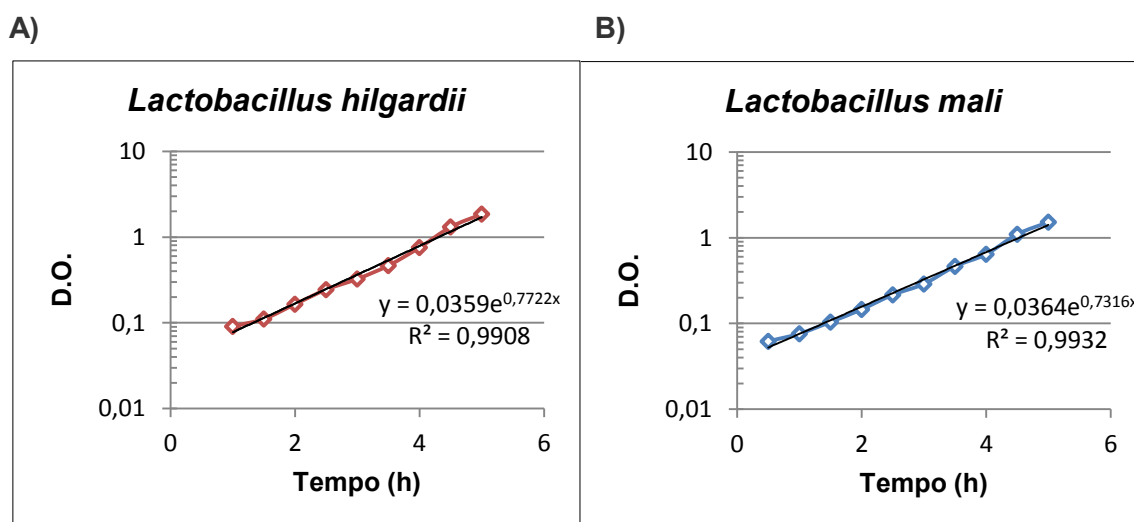


Figura 18 – Fase exponencial das curvas de crescimento para A) *Lactobacillus hilgardii* e B) *Lactobacillus mali*.

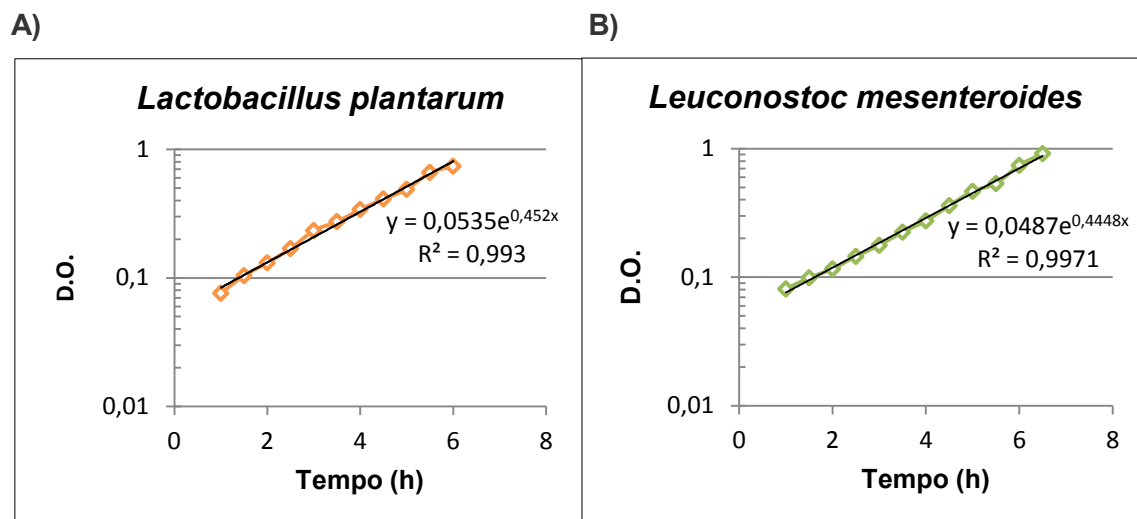


Figura 19 – Fase exponencial das curvas de crescimento para A) *Lactobacillus plantarum* e B) *Leuconostoc mesenteroides*.

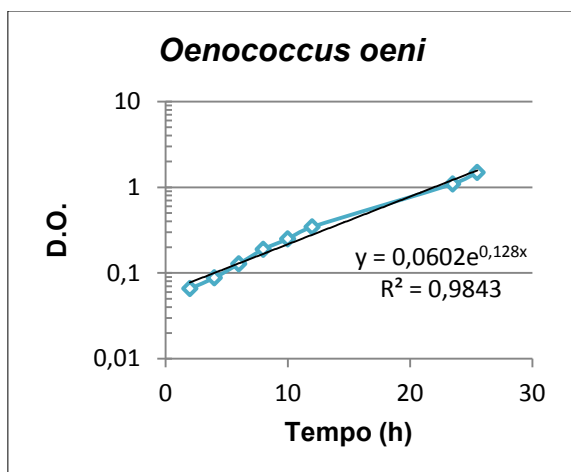


Figura 20 – Fase exponencial das curvas de crescimento para *Oenococcus oeni*.

Tabela 3 – Valores das taxas de crescimento na fase exponencial, para cada estirpe.

Estirpes	Taxas de Crescimento (h^{-1})
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0,77
<i>Lactobacillus mali</i>	0,73
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,45
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0,44
<i>Oenococcus oeni</i>	0,13

Das estirpes estudadas a que teve uma taxa de crescimento mais rápida foi *Lactobacillus hilgardii* ($0,77 h^{-1}$).

3.1.2 Relação entre UFC/mL e D.O., na fase exponencial

As figuras abaixo representam a relação entre UFC/mL com as D.O., para cada estirpe. Estes valores foram utilizados nos ensaios de morte térmica, nomeadamente nos cálculos para estimar um valor de células a inocular no ensaio (Figuras 21, 22 e 23).

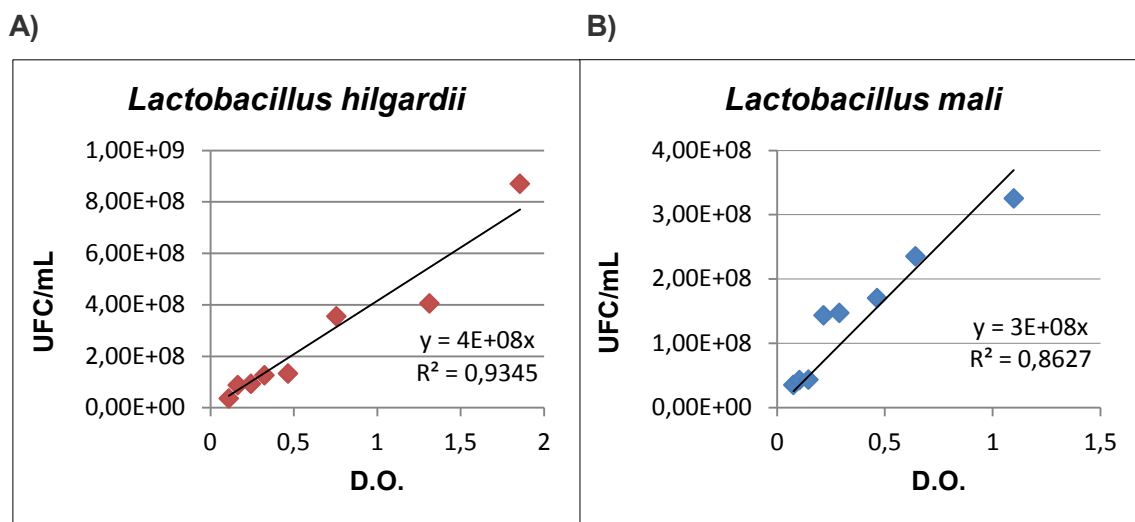


Figura 21 – Relação entre UFC/mL com D.O., para A) *Lactobacillus hilgardii* e B) *Lactobacillus mali*.

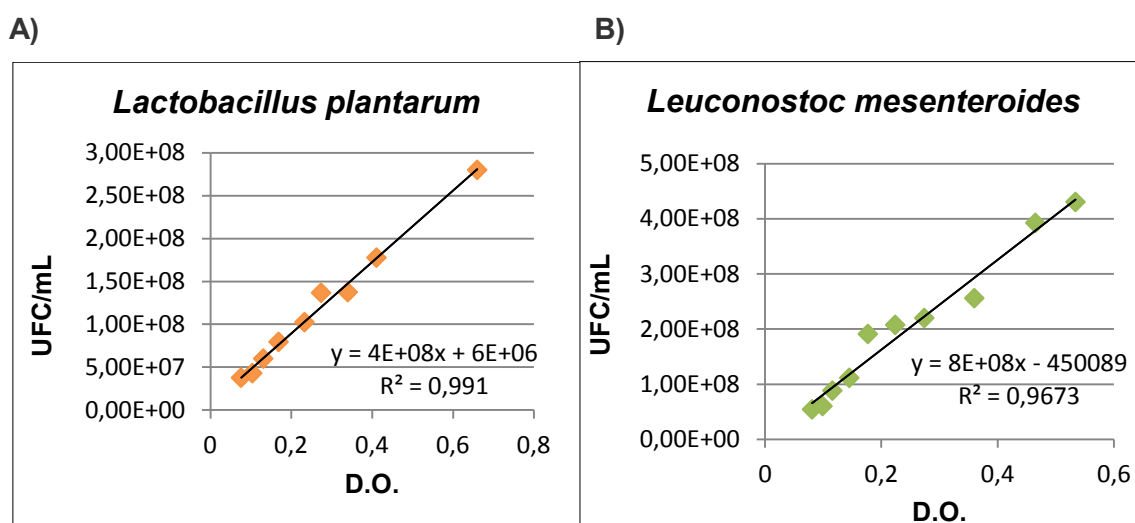


Figura 22 – Relação entre UFC/mL e D.O. para A) *Lactobacillus plantarum* e B) *Leuconostoc mesenteroides*

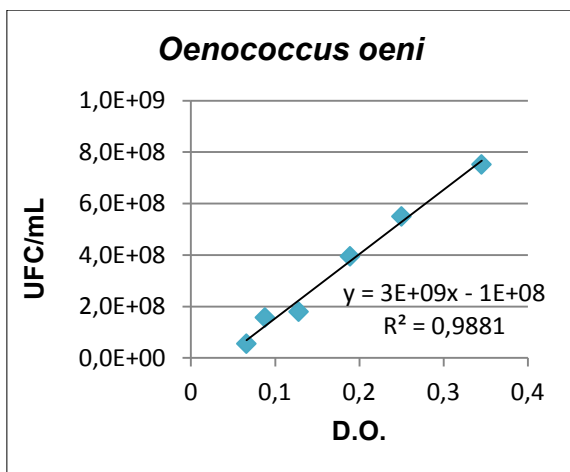


Figura 23 – Relação entre UFC/mL e D.O. para *Oenococcus oeni*.

3.2 Adaptação ao etanol

3.2.1 Inoculação em vinho

Apenas estão representados na Tabela 4, os resultados de uma das estirpes, *Lactobacillus hilgardii*. Neste ensaio apenas foi utilizada uma estirpe, para verificar se haveria ou não crescimento em vinho. Com base nos resultados obtidos (Tabela 4), já não foi feito em mais nenhuma estirpe.

Tabela 4 – Número de células (UFC/mL) em vinho, para a estirpe *Lactobacillus hilgardii*, nas diferentes percentagens de etanol, ao longo do tempo.

% Etanol (v/v)	Dias			
	0	1	2	3
1,5%	1,16 x 10 ³	5,00	<1	<1
3%	>3,00 x 10 ³	<1	<1	<1
5%	>3,00 x 10 ³	<1	<1	<1
7,5%	>3,00 x 10 ³	<1	<1	<1
10%	>3,00 x 10 ³	<1	<1	<1
11%	>3,00 x 10 ³	<1	<1	<1
12%	5,45 x 10 ²	<1	<1	<1
12,5%	1,10 x 10 ²	<1	<1	<1
13%	4,00 x 10 ¹	<1	<1	<1

Neste ensaio observou-se crescimento apenas no dia 0, para as diferentes percentagens de etanol. No dia 1 observou-se crescimento mas apenas para vinho com 1,5% de etanol. Nas restantes percentagens de etanol e nos restantes dias não se observou crescimento. Este comportamento está descrito na bibliografia, isto é,

casos em que bactérias isoladas de vinho, perdem a sua adaptação ao etanol. Daí seguidamente ter sido feita outra abordagem.

3.2.2 Teste de resistência ao etanol

3.2.2.1 Em vinho

Na Tabela 5 estão representados os resultados do crescimento em vinho, a diferentes percentagens de etanol, para todas as estirpes utilizadas neste trabalho. Para este ensaio apenas foram utilizadas as estirpes de *Lactobacillus plantarum*, *L. hilgardii* e *L. mali*, numa tentativa de obter resultados favoráveis, visto no ensaio anterior isso não ter acontecido.

Tabela 5 – Número de células (UFC/mL) em Vinho, por cada estirpe, nas diferentes percentagens de etanol, ao longo do tempo.

Estirpe	% Etanol (v/v)	Dias		
		0	1	2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	5%	$>3,00 \times 10^3$	$1,30 \times 10^2$	$5,00 \times 10^1$
	12%	$>3,00 \times 10^3$	<1	<1
<i>Lactobacillus mali</i>	0%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	5%	$>3,00 \times 10^3$	<1	5,00
	12%	$5,50 \times 10^1$	<1	<1
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	5%	$>3,00 \times 10^3$	<1	<1
	12%	$1,10 \times 10^2$	<1	<1

Na Tabela 5 pode-se verificar que para todas as estirpes, na ausência de etanol, o crescimento correspondeu a placas com colónias incontáveis, o que era de se esperar. Apenas *Lactobacillus plantarum* cresceu na presença das três percentagens de etanol no dia 0, com placas incontáveis. *Lactobacillus mali* e *L. hilgardii* apenas cresceram no dia 0, a 0% e 5% de etanol. A partir de 12% verificou-se uma diminuição significativa na quantidade de células. A partir do 1º e 2º dias, a 5% e 12% de etanol houve uma redução de células, sendo que a 12% no 1º dia, não se verificou crescimento. Verifica-se que a estirpe mais resistente é *Lactobacillus plantarum*, sendo *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus mali* menos resistentes ao etanol. Este resultado pode ser explicado pela sua perda de adaptação ao etanol.

3.2.2.2 Em MRS com etanol

Os resultados do crescimento em MRS com etanol, para as estirpes *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mali* e *Lactobacillus hilgardii*, estão apresentados na Tabela 6.

Neste ensaio apenas foram utilizadas três estirpes, numa tentativa de obter crescimento.

Tabela 6 – Número de células (UFC/mL) em MRS líquido, por cada estirpe, nas diferentes percentagens de etanol, ao longo do tempo.

Estirpe	% Etanol (v/v)	Dias	
		0	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1,5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	3%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	7,5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	10%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
<i>Lactobacillus mali</i>	1,5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	3%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	7,5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	10%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	1,5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	3%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	7,5%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	10%	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$

Na Tabela 6 é possível verificar que em qualquer uma das três estirpes e em qualquer percentagem de etanol, houve crescimento de células, estando mesmo incontáveis em placa. Isto significa que em MRS líquido com etanol, as bactérias crescem sem qualquer interferência aparente do etanol presente no meio. Estes resultados contrastam com os obtidos no ensaio anterior. Uma explicação possível é a existência de outros compostos no vinho que potenciam o efeito tóxico do etanol, que no caso do MRS líquido não estão presentes.

3.2.3 Adaptação ao etanol em vinho a partir de MRS com etanol

Neste ensaio o crescimento foi seguido por espalhamento em placa, aquando a inoculação em vinho (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de células (UFC/mL) no vinho, por cada estirpe, nas várias percentagens de etanol, ao longo do tempo.

Estirpe	Dias	% Etanol (v/v)		
		7,5%	7,5% *	10%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$	$>3,00 \times 10^3$
	1	$4,80 \times 10^2$	<1	<1
	2	$4,00 \times 10^1$	<1	<1
	3	5,00	<1	<1
	4	5,00	<1	<1
	5	<1	<1	<1
<i>Lactobacillus mali</i>	0	$>3,00 \times 10^3$	$3,85 \times 10^2$	$1,60 \times 10^2$
	1	$1,10 \times 10^2$	<1	<1
	2	$>3,00 \times 10^3$	<1	<1
	3	$>3,00 \times 10^3$	<1	<1
	4	$>3,00 \times 10^3$	<1	<1
	5	$2,65 \times 10^2$	<1	<1
	6	$>3,00 \times 10^3$	-	<1
	7	$3,30 \times 10^2$	-	<1
	8	$6,15 \times 10^2$	-	<1
	9	$1,96 \times 10^2$	-	<1
	10	<1	-	<1
	11	<1	-	<1
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	0	$6,55 \times 10^2$	$6,05 \times 10^2$	$2,30 \times 10^2$
	1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1
	3	<1	<1	<1
	4	$1,50 \times 10^2$	<1	<1
	5	<1	<1	<1
<i>Oenococcus oeni</i>	0	$1,35 \times 10^3$	$2,25 \times 10^2$	$2,60 \times 10^2$
	1	<1	<1	<1
	2	<1	<1	<1
	3	<1	<1	<1
	4	<1	<1	<1
	5	<1	<1	<1

*Inoculado a partir de um balão com MRS líquido com 10% de etanol.

Para as estirpes *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mali* e *Lactobacillus hilgardii* a morte é mais acentuada para MRS com 7,5 % de etanol quando o pré-inóculo foi proveniente de um balão com 10% de etanol. Este fenómeno pode ser explicado com

o facto de as bactérias poderem estar saturadas ou por terem estado num stresse mais elevado, devido a terem estado num balão com maior percentagem de etanol.

No caso de *Lactobacillus plantarum* a 7,5% de etanol existe uma acentuada diminuição de células ao longo dos dias. A 7,5%* e 10% de etanol, só houve crescimento no dia 0.

No caso de *Lactobacillus mali*, verifica-se que a 7,5% de etanol existe uma diminuição muito mais lenta do número de célula.

A 7,5%* e 10% de etanol, só se verifica crescimento no dia 0, observando-se este fenómeno também no *Lactobacillus hilgardii* e *Oenococcus oeni*. Uma explicação possível para isto deve-se a estas bactérias não estarem adaptadas ao etanol, e como foram adaptadas a partir de MRS com etanol, quando inoculadas em vinho, continuam a não estar adaptadas ao etanol, sendo o vinho um meio com diferentes características que MRS com etanol.

Segundo este ensaio a bactéria menos resistente é *Oenococcus oeni*, crescendo apenas no dia 0. A bactéria mais resistente é *Lactobacillus mali*, pois a 7,5% de etanol, é a bactéria que demora mais tempo a morrer.

Os resultados obtidos não estão de acordo com a bibliografia, uma vez que está descrito que *Oenococcus oeni* é uma estirpe resistente ao etanol.

3.2.4 MRS com etanol

Visto nos ensaios anteriores se ter verificado uma fraca adaptação em vinho optou-se por fazer a adaptação ao etanol com MRS líquido com várias percentagens de etanol. Este ensaio foi realizado previamente aos ensaios de morte térmica. Foi utilizado o tubo de ensaio com MRS com 10% de etanol, em vez de 12,5%, uma vez que nesta ultima percentagem as bactérias tinham crescimento lento. As bactérias em MRS com 10% de etanol, foram refrescadas em meio MRS, para posterior utilização nos ensaios de morte térmica.

3.3 Morte térmica

Em face dos resultados anteriores, o ensaio de morte térmica foi realizado em meio MRS com 10% (v/v) de etanol. Para cada estirpe foram testadas 4 temperaturas, 38°C, 40°C, 42°C e 44°C. A excepção foi *Oenococcus oeni* CECT 217^T para a qual foram testadas as temperaturas de 40°C, 42°C, 44°C e 46°C.

3.3.1 Determinação dos Valores de D

A Figura 24, representa as curvas de morte térmica para a estirpe *Lactobacillus hilgardii*.

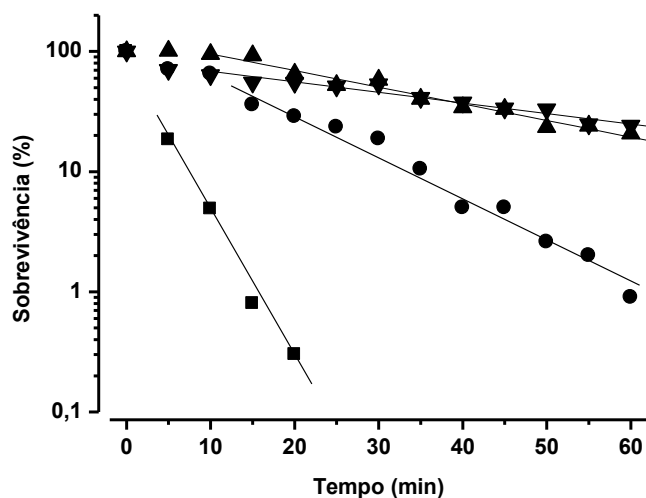


Figura 24 – Valores de D para *Lactobacillus hilgardii* em que (▼) 38°C, (▲) 40°C, (●) 42°C e (■) 44°C.

Na figura 24 observa-se que à medida que a temperatura de tratamento aplicada aumenta, maior é o declive da recta. À temperatura de 38°C e 40°C o declive da recta foi menor, o que indica a falta de eficiência do tratamento térmico. A 42°C observou-se uma recta com declive mais acentuado. Para os 38°C, 40°C e 42°C o tratamento não resulta numa completa eliminação das bactérias, durante o tempo da experiência. A 44°C, verificou-se sim, uma recta com uma inclinação bastante acentuada, havendo uma eliminação bacteriana, verificada aos 25 minutos. Os valores D para este estirpe foram: $D_{38}=116$ minutos, $D_{40}=79,4$ minutos, $D_{42}=32,6$ minutos e $D_{44}=8,4$ minutos.

A Figura 25, representa as curvas de morte térmica para a estirpe *Lactobacillus mali*.

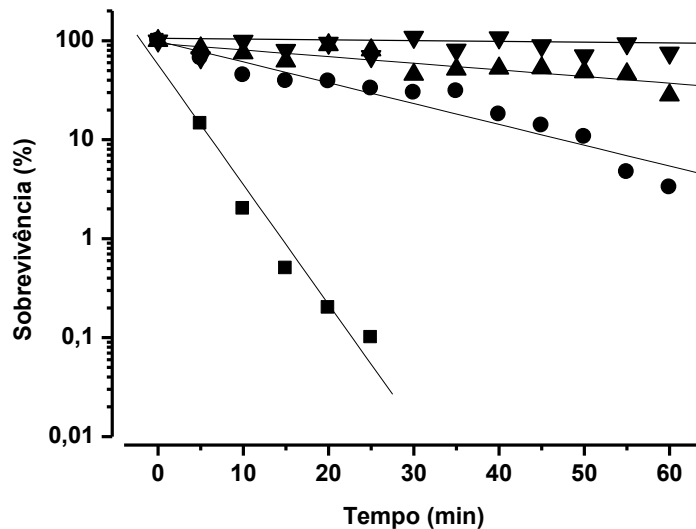


Figura 25 – Valores de D para *Lactobacillus mali* em que (▼) 38°C, (▲) 40°C, (●) 42°C e (■) 44°C.

A temperatura de 38°C foi excluída dos cálculos de D, devido à não eficácia do tratamento. Verificou-se que à medida que a temperatura do tratamento aumentou (de 40°C para 44°C), também aumentou o declive da recta. A 40°C e a 42°C observou-se um declive um pouco mais acentuado e em ambos os casos não se verificou uma completa eliminação das bactérias, durante o tempo da experiência. A 44°C observa-se um declive mais acentuado, verificando-se morte térmica a partir dos 5 minutos, havendo uma completa eliminação verificada os 30 minutos. Os valores D para esta estirpe são: $D_{40}=142$ minutos, $D_{42}=45,1$ minutos e $D_{44}=8,3$ minutos.

A Figura 26, representa as curvas de morte térmica para a estirpe *Lactobacillus plantarum*.

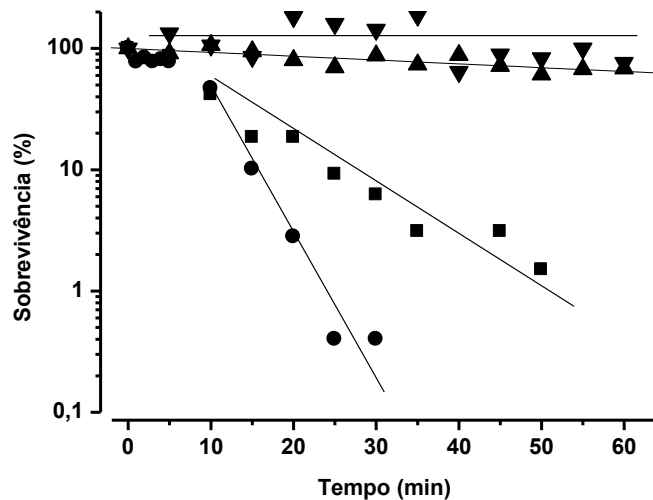


Figura 26 – Valores de D para *Lactobacillus plantarum* em que (▼) 38°C, (▲) 40°C, (■) 42°C e (●) 44°C.

Mais uma vez, devido à não eficiência do tratamento a 38°C esta temperatura foi excluída, dos cálculos do valor D. A 40°C verificou-se um declive da recta, mas muito ligeiro e não se verificou uma completa eliminação das bactérias. A 42°C e a 44°C observou-se uma morte térmica a partir dos 10 minutos. Existe uma eliminação completa das bactérias lácticas nos dois casos, sendo que a 44°C as bactérias morrem a partir dos 35 minutos e a 42°C morrem a 55 minutos. Os valores D para esta estirpe são: $D_{40}=356$ minutos, $D_{42}=24$ minutos e $D_{44}=8,4$ minutos.

A Figura 27, representa as curvas de morte térmica para a estirpe *Leuconostoc mesenteroides*.

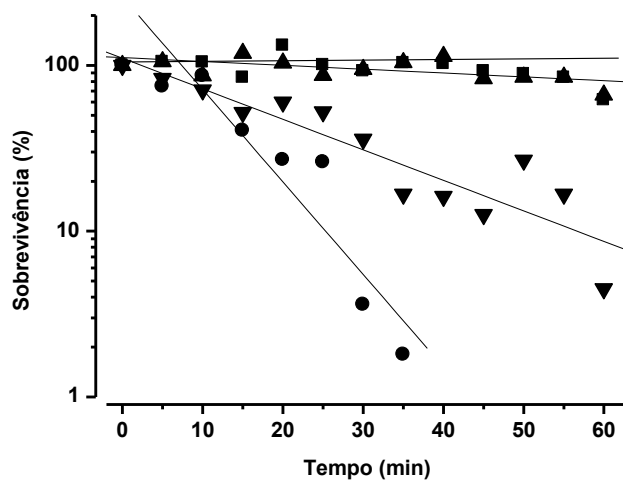


Figura 27 – Valores de D para *Leuconostoc mesenteroides* em que (■) 38°C, (▲) 40°C, (▼) 42°C e (●) 44°C.

Como anteriormente, devido à não eficiência do tratamento a 38°C esta temperatura foi excluída. A 40°C e a 42°C verificou-se a morte muito lenta das bactérias. Nestes dois casos não existe uma completa morte das bactérias. A 44°C a morte térmica verifica-se a partir dos 5 minutos, existindo uma completa morte das bactérias aos 40 minutos. Os valores D para esta estirpe são: $D_{40}=355$ minutos, $D_{42}=60,4$ minutos e $D_{44}=20,6$ minutos.

A Figura 28, representa as curvas de morte térmica para a estirpe *Oenococcus oeni*.

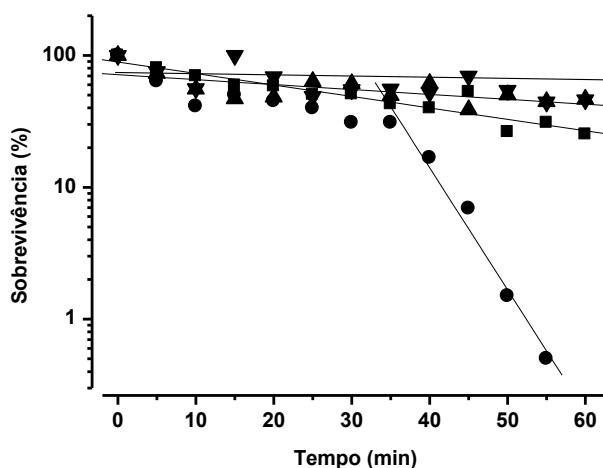


Figura 28 – Valores de D para *Oenococcus oeni* em que: (▼) 40°C, (▲) 42°C, (■) 44°C e (●) 46°C.

Neste caso a temperatura de 40°C foi excluída, por não se verificar morte térmica. A 42°C e 44°C os declives da recta não são muito acentuados, sendo a 44°C mais acentuado que a 42°C, o que significa que as bactérias estão a morrer mas muito lentamente a 42°C e o tratamento não é totalmente eficaz. A 46°C observa-se morte a partir dos 35 minutos, havendo uma completa morte aos 60 minutos. Os valores D para esta estirpe são: D_{42} =232 minutos, D_{44} =140,7 minutos e D_{46} =36,6 minutos.

A bactéria mais resistente á temperatura foi *Oenococcus oeni*. Os valores de D variam de 232 minutos (42°C) a 36,6 minutos (46°C). A temperatura mais eficaz foi 46°C.

Podemos comparar os valores de D_{42} para todas as estirpes, para *Lactobacillus hilgardii* D_{42} =32,6 minutos, *Lactobacillus mali* D_{42} =45,1 minutos, *Lactobacillus plantarum* D_{42} =24 minutos, *Leuconostoc mesenteroides* D_{42} =60,4 minutos e *Oenococcus oeni* D_{42} =232 minutos. A partir destes valores podemos verificar que para a mesma temperatura *Oenococcus oeni* o tempo de redução decimal é maior (232 minutos), enquanto para *Lactobacillus plantarum* é menor (24 minutos) (Tabela 8).

3.3.2 Determinação dos Valores de Z

Na Figura 29 estão representados os valores de Z calculados com base nos valores de D, apresentados no ponto anterior, para todas as estirpes.

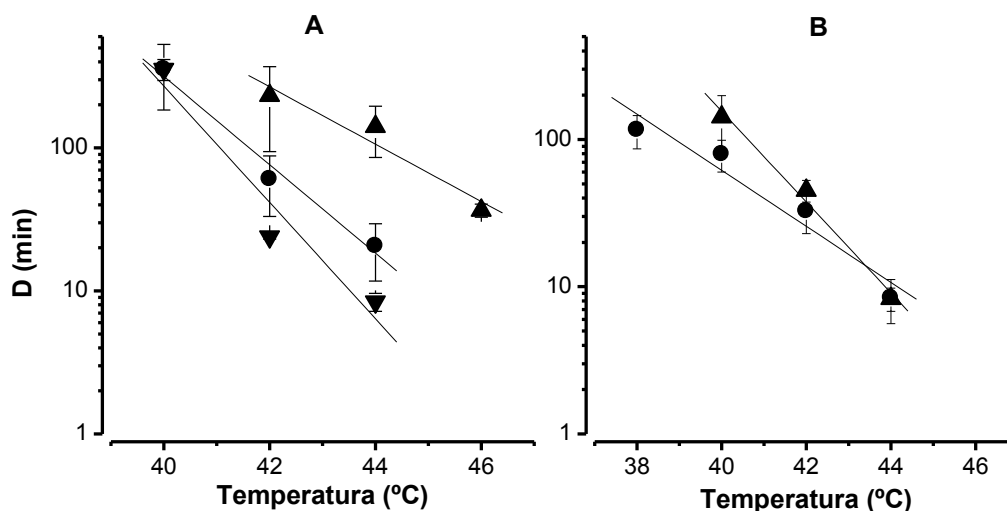


Figura 29 – Valores de Z em A) (▲) *Oenococcus oeni*; (●) *Leuconostoc mesenteroides*; (▼) *Lactobacillus plantarum*; B) (●) *Lactobacillus hilgardii*; (▲) *Lactobacillus mali*.

Os valores de Z foram calculados a partir de 1/ módulo do declive da recta do gráfico acima apresentado, dos valores de D em função da temperatura. Pode verificar-se que os valores de Z estão próximos do valor normalmente registado para células vegetativas de 5°C (Adams e Moss., 1995). Note-se que *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus mali* e *Leuconostoc mesenteroides* têm valores inferiores a esse valor, 2,5°C para *Lactobacillus plantarum* e 3,2°C para as outras duas espécies. Estes valores representam o aumento de temperatura necessário para reduzir 10 vezes (um ciclo logarítmico) o valor D. Ter um valor de Z maior representa que a estirpe é mais resistente e por isso necessita de um maior aumento de temperatura. A estirpe mais resistente foi *Lactobacillus hilgardii*, Z=5,3°C, e seguidamente *Oenococcus oeni* com Z=5°C.

Os valores de D e Z, para cada estirpe estão registados na Tabela 8.

Tabela 8 – Os vários valores de D e Z, para as diferentes estirpes de bactérias lácticas.

Estirpe	T (°C)	Valores de D	Valores de Z
<i>Lactobacillus plantarum</i>	40	356 ± 172 min.	2,5 °C
	42	24 ± 1 min.	
	44	8,4 ± 1,2 min.	
<i>Lactobacillus mali</i>	40	142,2 ± 56,1 min.	3,2 °C
	42	45,1 ± 7,6 min.	
	44	8,3 ± 1,5 min.	
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	38	116,0 ± 29,5 min.	5,3 °C
	40	79,4 ± 19,3 min.	
	42	32,6 ± 9,7 min.	
	44	8,4 ± 2,8 min.	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	40	355 ± 59 min.	3,2 °C
	42	60,4 ± 27,3 min.	
	44	20,6 ± 8,9 min.	
<i>Oenococcus oeni</i>	42	232 ± 138 min.	5,0 °C
	44	140,7 ± 54,9 min.	
	46	36,6 ± 3,9 min.	

De acordo com Splittstoesser (1975), os valores de D obtidos para as estirpes *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Oenococcus oeni*, são muito mais baixos que os obtidos neste trabalho. O que pode ser justificado pelo ensaio de Splittstoesser (1975), ter sido efectuado em vinho com 12,1% etanol, a quantidade inicial de células seria menor, sendo por isso necessário menos tempo de redução decimal.

Na Tabela 9 estão representados dos valores de D_T . São temperaturas habitualmente consideradas de pasteurização. Estes valores foram calculados a partir da fórmula de obtenção dos valores de Z ($Z = (T_2 - T_1)/(\log D_1 - \log D_2)$).

Tabela 9 – Valores de D_T , em segundos.

Estirpe	T (°C)			
	60	70	80	90
<i>Lactobacillus plantarum</i>	$3,34 \times 10^{-6}$ s	2×10^{-8} s	$2,00 \times 10^{-12}$ s	$2,00 \times 10^{-16}$ s
<i>Lactobacillus mali</i>	$8,3 \times 10^{-5}$ s	$3,73 \times 10^{-6}$ s	$2,80 \times 10^{-9}$ s	$2,1 \times 10^{-12}$ s
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	$8,04 \times 10^{-3}$ s	$6,26 \times 10^{-3}$ s	$8,13 \times 10^{-5}$ s	$1,05 \times 10^{-6}$ s
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	$2,06 \times 10^{-4}$ s	$9,27 \times 10^{-7}$ s	$6,95 \times 10^{-9}$ s	$5,21 \times 10^{-12}$ s
<i>Oenococcus oeni</i>	$1,5 \times 10^{-3}$ s	$3,48 \times 10^{-2}$ s	$3,48 \times 10^{-4}$ s	$3,48 \times 10^{-6}$ s

Através da Tabela 9, verifica-se que nas temperaturas de pasteurização, é necessário um tempo muito reduzido de valor D, ou seja mesmo inferior a 1 segundo, para reduzir

90% da população. Como na prática industrial se utilizam valores de 6 D na pasteurização, verificamos que basta menos de 1 segundo, para conseguir uma redução térmica aceitável.

4. Conclusão

Este trabalho prático foi importante para obtermos valores dos parâmetros de morte térmica, relativos a bactérias lácticas, num meio com elevado teor de etanol. Isto porque estas bactérias são frequentemente isoladas de vinho ou mosto de vinho, onde são muitas vezes responsáveis por alterações indesejáveis.

A partir dos resultados da adaptação ao etanol, podemos concluir que a melhor abordagem não é inocular directamente em vinho, uma vez que as bactérias por não estarem adaptadas ao etanol, não conseguiram crescer. A adaptação ao etanol em MRS com 10% de etanol, permitiu obter sempre crescimento das bactérias.

Para *Lactobacillus hilgardii* os valores D variaram entre 116 a 8,4 minutos (38°C a 44°C). Para *Lactobacillus mali* variaram entre 142 a 8,3 minutos (40°C a 44°C). Para *Lactobacillus plantarum* variaram entre 356 a 8,4 minutos (40°C a 44°C). Para *Leuconostoc mesenteroides* variaram entre 355 a 20,6 minutos (40°C a 44°C) e para *Oenococcus oeni* variaram entre 232 a 36,6 minutos (42°C a 46°C).

A estirpe que apresentou uma temperatura mais baixa de inactivação foi *Lactobacillus hilgardii* a 38°C com $D_{38}=116$ minutos, e a que apresentou uma temperatura mais elevada foi *Oenococcus oeni* a 46°C com $D_{46}=36,6$ minutos.

Os valores de Z obtidos estavam próximos do esperado (5°C para células vegetativas), sendo que *Lactobacillus plantarum* apresentou uma menor resistência térmica, $Z=2,5^{\circ}\text{C}$, e as estirpes *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus mali* apresentaram um valor $Z=3,2^{\circ}\text{C}$. O *Oenococcus oeni*, foi o que apresentou uma resistência térmica maior, $Z=5,3^{\circ}\text{C}$, mas ainda assim dentro do esperado, e *Lactobacillus hilgardii*, apresentou uma resistência térmica de $Z=5^{\circ}\text{C}$.

Em face da incapacidade de obter crescimento em vinhos é de admitir que estes valores de D e Z, seriam mais baixos se se tivesse utilizado vinho na sua determinação. Como na prática industrial se pretendem reduções de 6 D, consegue-se uma redução térmica aceitável em menos de 1 segundo a 60°C.

5. Bibliografia

Adams, M.R., Moss, M.O. 1995. *Food Microbiology*. Cambridge : The Royal Society of Chemistry.

Bae, S., Fleet, G.H., Heard, G.M. 2006. Lactic acid bacteria associated with wine grapes from several Australian vineyards. *Journal of Applied Microbiology* 100:712-727.

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M. e Loureiro, V. 2012. The microbial ecology of wine grape berries. *International Journal of Food Microbiology*. 153:243–259.

Bartowsky, E.J. 2008. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Letters in Applied Microbiology*. 48:149-156.

Bringel, F., Castioni, A., Olukoya, D.K., Felis, G.E., Torriani, S., Dellaglio, F. 2005. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55:1629-1634.

Cardoso, A. D. 2007. *O Vinho - da Uva à Garrafa*. Âncora Editora, Coimbra, Portugal.

Chang, I. S., Kim, B. H. and Shin, P. K. 1997. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:1–6.

Chu-Ky, S., Tournet-Marechal, R.; Marechal, P.; Guzzo, J. 2005. Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: Effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1717:118-124.

Cox, D. J. 1991. Studies on the energetics and growth benefits of malolactic fermentation in lactic acid bacteria. *Cornell University*.

Cox, D. J., Henick-Kling, T. 1989. Chemiosmotic energy from malolactic fermentation. *The Journal of Applied Bacteriology* . 171: 5750–5752.

Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G. H., Lee, T. H. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: Their potential enological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*. 39:137–142.

Delfini, C., Morsiani, M. G. 1992. Resistance to sulfur dioxide of malolactic strains of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus* sp. isolated from wines. *Sciences des Aliments*. 12:493–511.

Dicks, L.M.T., Dellaglio, F., Collins, M.D. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* (corrige.) gen. nov. comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:395-397.

Dicks, L.M.T., Endo, A. 2009. Taxonomic Status of Lactic Acid Bacteria in Wine and Key Characteristics to Differentiate Species. *South Africa Journal Enology Viticulture* 30:72-90.

Flanzy, C. 2003. *Enologia: Fundamentos Científicos Y Tecnológicos.* s.l. : AMV Ediciones, Madrid.

Fugelsang, K. C., Edwards, C. G. 2007. *Wine Microbiology - Pratical Applications and Procedures.* USA : Springer.

G-Alegría, E., et al. 2004. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters.* 230: 53–61.

Guerzoni, M. E., et al. 1995. Effects of pH, temperature, ethanol, and malate concentration on *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc oenos*: Modelling of the malolactic activity. *American Journal of Enology and Viticulture.* 3:368–374.

Guzzo, J. and Desroche, N. 2009. Physical and chemical stress factors in lactic acid bacteria. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine.* Berlin: Springer-Verlag.

Henick-Kling, T. 1986. Growth and metabolism of *Leuconostoc oenos* and *Lactobacillus plantarum* in wine. PhD thesis. *University of Adelaide*, South Australia

Henick-Kling, T. 1993. Malolactic fermentation. *Wine microbiology and biotechnology.* Chur: Harwood Academic.

Hutkins, R. W., Nannen, N. 1993. pH homeostasis in lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science.* 76:2354–2365.

König, H., Fröhlich, J. 2009. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine.* Berlin : Springer-Verlag.

Lepe, J.A.S., Leal, B.I. 2004. *Microbiología Enológica - Fundamentos de Vinificación.* Espanha : Ediciones Mundi-Prensa.

Lonvaud-Funel, A. 1995. Microbiology of the malolactic fermentation: Molecular aspects. *FEMS Microbiology Letters*. 126:209–214.

Lonvaud-Funel, A. 2001. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 199:9-13.

Lonvaud-Funel, A., Renouf, V., Strehaiano, P. 2010. *Microbiologie du vin - Bases fondamentales et applications*. Paris : Editions TEC & DOC.

Mira de Orduña, R., Patchett, M.L., Liu, S.-Q., Pilone, G.J. (2001). Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1657-1662.

McDonald, L. C., Fleming, H. P. and Hassan, H. M. 1990. Acid tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56:2120–2124.

Moreno-Arribas, M.V. Polo, M. C., Jorganes, F., Muñoz, R. 2002. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology*. 84:117-123.

Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. 2009. *Wine Chemistry and Biochemistry*. Madrid: Springer.

Osborne, J.P., Ordunã, R.M.; Pilone, G.J.; Liu, S.-Q. 2000. Acetaldehyde metabolism by wine lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 191:51-55.

Peynaud, E., Domercq, S. 1968. Étude de quatre cents souches de coques hétérolactiques isolés de vins. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille*. 19:159–170.

Radler, F. 1966. Die mikrobiologischen grundlagen des säureabbaus in wein. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde*. 120: 237–287.

Ribéreau-Gayon, J., et al. 1975. *Sciences et techniques du vin*. Paris: Dunod. Vol. 2.

Ribéreau-Gayon, P., et al. 2006. Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications. Chichester: Wiley. Vol. 1.

Silva, I., Campos, F.M., Hogg, T., Couto, J. A. 2011. Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 145:471-475.

Spittstoesser, D.F., Lienk, L.L., Wilkison, M., Stamer, J.R. 1975. Influence of Wine Composition on the Heat Resistance of Potential Spoilage Organisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 30:369-373.

Terrade, N., Orduña, R. M. 2009. Determination of the essential nutrient requirements of wine-related bacteria from the genera *Oenococcus* and *Lactobacillus*. *International Journal of Food Microbiology*. 133:8-13.

Toit, M., Engelbrecht, L., Lerm, E., Krieger-Weber, S. 2011. *Lactobacillus*: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures—an Overview. *Food Bioprocess Technol*. 4: 876-906.

Wibowo, D., Eschenbruch, R., Davis, D. R., Fleet, G. H., Lee, T. H. 1985. Occurrence and growth of lactic acid bacteria in wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36:302-313.

Wisselink, H.W., Weusthuis, R.A., Eggink, G., Hugenholtz, J., Grobbs, G.J. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal*. 12:151-161.

Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., Uden, G. 2006. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology Biotechnology*. 72:421-429.

6. Anexos

Anexo I

Composição do meio MRS sólido (para 1L)

Componentes	Quantidade (g)
Polipectona	10
Extrato de Carne	10
Extrato de Levedura	5
Glucose	20
Tween 80	1,08
Fosfato Dipotássico	2
Acetato de Sódio	5
Citrato de Amônio	2
Sulfato de Magnésio	0,2
Sulfato de Manganês	0,05
*Agar-Agar	20
Água Desmineralizada	1000 mL

Esterilização a 121°C, 15 minutos e arrefecimento em Banho de água a 50°C.

*O Agar-Agar é adicionado apenas para meio sólido.

Anexo II

Composição inicial do vinho comercial

Massa volúmica a 20°C	0,9927 g/cm ³
Teor alcoólico volumétrico a 20°C	12,7%
Acidez total expressa em Ácido Tartárico	4,9 g/dm ³
Acidez fixa expressa em Ácido Tartárico	4,1 g/dm ³
Acidez volátil corrigida expresso em ácido acético	0,62 g/dm ³
pH	3,50
Anidrido Sulfuroso livre	34 mg/dm ³
Anidrido Sulfuroso Total	140 mg/dm ³
Açúcares	1,9 g/dm ³

Anexo III

Valores de D.O., e UFC/mL em função do tempo em horas.

Lactobacillus hilgardii

	Tempo (h)	D.O.	Média UFC/mL
t ₀	0	0,055	1,5 x 10 ⁷
t ₁	0,5	0,073	2,03 x 10 ⁷
t ₂	1	0,091	2,15 x 10 ⁷
t ₃	1,5	0,111	3,58 x 10 ⁷
t ₄	2	0,165	8,75 x 10 ⁷
t ₅	2,5	0,244	9,27 x 10 ⁷
t ₆	3	0,325	1,26 x 10 ⁸
t ₇	3,5	0,466	1,33 x 10 ⁸
t ₈	4	0,756	3,55 x 10 ⁸
t ₉	4,5	1,314	4,05 x 10 ⁸
t ₁₀	5	1,856	8,7 x 10 ⁸
t ₁₁	5,5	2,09	1,44 x 10 ⁹
t ₁₂	6	2,706	1,62 x 10 ⁹
t ₁₃	6,5	3,36	1,9 x 10 ⁹
t ₁₄	7	4,056	2,4 x 10 ⁹
t ₁₅	7,67	5,052	3,7 x 10 ⁹
t ₁₆	8,17	5,53	4,32 x 10 ⁹
t ₁₇	9,17	7,068	4,34 x 10 ⁹

Lactobacillus mali

	Tempo (h)	D.O.	Média UFC/mL
t ₀	0	0,059	1,80 x 10 ⁷
t ₁	0,5	0,062	2,28 x 10 ⁷
t ₂	1	0,076	3,50 x 10 ⁷
t ₃	1,5	0,104	4,25 x 10 ⁷
t ₄	2	0,146	4,32 x 10 ⁷
t ₅	2,5	0,216	1,43 x 10 ⁸
t ₆	3	0,289	1,47 x 10 ⁸
t ₇	3,5	0,464	1,7 x 10 ⁸
t ₈	4	0,642	2,35 x 10 ⁸
t ₉	4,5	1,098	3,25 x 10 ⁸
t ₁₀	5	1,521	1,37 x 10 ⁹
t ₁₁	5,5	1,83	2,1 x 10 ⁹
t ₁₂	6	2,472	2,15 x 10 ⁹
t ₁₃	6,5	3,262	2,42 x 10 ⁹
t ₁₄	7	5,904	2,52 x 10 ⁹
t ₁₅	7,67	6,422	2,91 x 10 ⁹
t ₁₆	8,17	6,888	1,21 x 10 ¹⁰
t ₁₇	9,17	7,728	2,16 x 10 ¹⁰

Lactobacillus plantarum

	Tempo (h)	D.O.	Média UFC/mL
t ₀	0	0,053	3,5 x 10 ⁷
t ₁	1	0,076	3,8 x 10 ⁷
t ₂	1,5	0,104	4,3 x 10 ⁷
t ₃	2	0,131	6 x 10 ⁷
t ₄	2,5	0,169	8 x 10 ⁷
t ₅	3	0,233	1 x 10 ⁸
t ₆	3,5	0,274	1,4 x 10 ⁸
t ₇	4	0,34	1,4 x 10 ⁸
t ₈	4,5	0,411	1,8 x 10 ⁸
t ₉	5	0,488	2,5 x 10 ⁸
t ₁₀	5,5	0,66	2,8 x 10 ⁸
t ₁₁	6	0,738	2,8 x 10 ⁸
t ₁₂	6,5	0,73	3,5 x 10 ⁸
t ₁₃	7	1,016	6,1 x 10 ⁸
t ₁₄	7,5	1,179	6,2 x 10 ⁸
t ₁₅	8	1,284	1,7 x 10 ⁹
t ₁₆	8,5	1,432	3,2 x 10 ⁹
t ₁₇	9	1,484	3,5 x 10 ⁹
t ₁₈	9,5	1,648	4,4 x 10 ⁹
t ₁₉	10	1,868	4,8 x 10 ⁹

Leuconostoc mesenteroides

	Tempo (h)	D.O.	Média UFC/mL
t₀	0	0,06	$3,02 \times 10^7$
t₁	1	0,081	$5,42 \times 10^7$
t₂	1,5	0,099	$6,02 \times 10^7$
t₃	2	0,116	$8,82 \times 10^7$
t₄	2,5	0,145	$1,12 \times 10^8$
t₅	3	0,177	$1,91 \times 10^8$
t₆	3,5	0,224	$2,08 \times 10^8$
t₇	4	0,274	$2,2 \times 10^8$
t₈	4,5	0,36	$2,56 \times 10^8$
t₉	5	0,465	$3,93 \times 10^8$
t₁₀	5,5	0,534	$4,31 \times 10^8$
t₁₁	6	0,74	$4,43 \times 10^8$
t₁₂	6,5	0,914	$5,25 \times 10^8$
t₁₃	7	0,933	$7,05 \times 10^8$
t₁₄	7,5	0,966	$7,3 \times 10^8$
t₁₅	8	1,011	$7,73 \times 10^8$
t₁₆	8,5	0,975	$8,2 \times 10^8$

Oenococcus oeni

	Tempo (h)	D.O.	Média UFC/mL
t₀	0	0,049	$1,20 \times 10^7$
t₁	2	0,066	$5,55 \times 10^7$
t₂	4	0,088	$1,57 \times 10^8$
t₃	6	0,128	$1,8 \times 10^8$
t₄	8	0,189	$3,95 \times 10^8$
t₅	10	0,25	$5,5 \times 10^8$
t₆	12	0,345	$7,52 \times 10^8$
t₇	23,5	1,092	$1,06 \times 10^9$
t₈	25,5	1,488	$1,48 \times 10^9$
t₉	27,5	1,584	$5,01 \times 10^9$
t₁₀	29,5	1,596	$5,13 \times 10^9$